

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
GENEETIKA ÕPPETOOL

Kaarel Laak

**Alküültransferaasi-sarnase valgu osalus mutatsiooniprotsessides
bakteris *Pseudomonas putida***

Bakalaureusetöö

Juhendajad Ph.D. Signe Saumaa
Ph.D. Maia Kivisaar

TARTU 2013

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. DNA kahjustused	7
1.1.1. Alkүүлivad ühendid.....	7
1.1.2. DNA alküülkahjustused	8
1.1.3. Raku vastus DNA kahjustustele.....	11
1.2. DNA reparatsioon bakterites	12
1.2.1. DNA paardumisvigade reparatsioonisüsteem (MMR)	12
1.2.2. Nukleotiidi väljalõike reparatsioonisüsteem (NER).....	13
1.2.3. Lämmastikaluste väljalõike reparatsioon (BER)	15
1.2.4. GO reparatsioon.....	15
1.2.5. Homoloogiline rekombinatsioon	16
1.3. DNA alküülkahjustuste reparatsioon	17
1.3.1. Alkүүлtransferaasi sarnane valk (ATL).....	19
1.4. Statsionaarse faasi mutagenees	23
1.4.1. Statsionaarse faasi mutatsioonide tekkemehhanismid.....	23
1.4.2. Statsionaarse faasi mutagenees <i>E. coli</i> tüves FC40	25
1.4.3. Spetsialiseeritud DNA polümeraaside osalus statsionaarse faasi mutageneesis ...	26
1.4.4. Statsionaarse faasi mutagenees bakteris <i>Pseudomonas putida</i>	27
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	29
2.1. Töö eesmärgid	29
2.2. Materjalid ja meetodika	30
2.2.1. Töös kasutatud söötmed, plasmiidid ja bakteritüved.....	30
2.2.2. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)	32
2.2.3. Geelelektroforees.....	34
2.2.4. DNA sadestamine	34
2.2.5. DNA ligeerimine.....	34
2.2.6. Plasmidse DNA eraldamine ja DNA restriksioon	35
2.2.7. Aluselise fosfataasi töötlus ja Klenowi töötlus.....	35
2.2.8. DNA sekveneerimine.....	35
2.2.9. Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon	36

2.2.10. Kloneerimine	37
2.2.11. Bakterite konjugatsioon	37
2.2.12. UV-test	37
2.2.13. <i>P. putida</i> ATL defektse tüve konstrueerimine	38
2.2.14. <i>P. putida</i> tüvede PaWUvrB ja PaWUvrAUvrB konstrueerimine	39
2.2.15. <i>P. putida</i> tüvede PaWATLUvrA, PaWATLUvrA2 ja PaWATLUvrB konstrueerimine.....	40
2.2.16. <i>P. putida</i> PaWATLUvrAUvrB defektse tüve konstrueerimine	40
2.2.17. Phe ⁺ mutantide isoleerimine	40
2.2.18. <i>P. putida</i> rifampitsiini-resistentsete mutantide tekkesageduse määramine	42
2.3. Tulemused ja arutelu	42
2.3.1. Mutatsiooniprotsesside uurimiseks vajalike <i>P. putida</i> tüvede konstrueerimine....	43
2.3.2. DNA alküülkahjustuste reparatsioonis osaleva <i>atl</i> geeni ja NER raja geenide topeltdefektsuse koosmõju mutatsioonisagedusele kasvavates <i>P. putida</i> rakkudes	43
2.3.3. DNA alküülkahjustuste reparatsioonis osaleva <i>atl</i> geeni defektsuse mõju mutatsioonisagedusele nälgivates <i>P. putida</i> rakkudes.....	46
2.3.4. DNA alküülkahjustuste reparatsioonis osaleva <i>atl</i> geeni ja NER raja geeni <i>uvrA</i> topeltdefektsuse koosmõju mutatsioonisagedusele nälgivates <i>P. putida</i> rakkudes.	48
2.3.5. DNA alküülkahjustuste reparatsioonis osaleva <i>atl</i> geeni ja NER raja geeni <i>uvrB</i> topeltdefektsuse koosmõju mutatsioonisagedusele nälgivates <i>P. putida</i> rakkudes	51
2.3.6. DNA alküülkahjustuste reparatsioonis osaleva <i>atl</i> geeni ja NER süsteemi kuuluva geeni <i>uvrA2</i> topeltdefektsuse koosmõju mutatsioonisagedusele nälgivates <i>P. putida</i> rakkudes	53
2.3.7. DNA alküülkahjustuste reparatsioonis osaleva <i>atl</i> geeni ja NER süsteemi kuuluvate <i>uvrA</i> ja <i>uvrB</i> geenide defektsuse koosmõju mutatsioonisagedusele nälgivates <i>P. putida</i> rakkudes.....	55
KOKKUVÕTE	58
RESÜMEE	59
KIRJANDUSE LOETELU	60
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	73

KASUTATUD LÜHENDID

$\cdot\text{O}_2^-$ - superoksiidradikaal

$\cdot\text{OH}$ - hüdroksüülradikaal

8-oksüG- 7,8-dihüdro-8-oksüguaniin

Amp- ampitsilliin

AP-koht- *apurinic/apyrimidinic site*

ATL- alküültransferaasi sarnane valk (*alkyltransferase-like protein*)

BER- lämmastikaluse väljalõike reparatsioon (*base excision repair*)

CAA- *cosamino acid*

Cb- karbenitsilliin

CFU- kolooniaid moodustavate rakkude arv (*Colony Forming Units*)

Chi- *crossover hotspot instigator*

DMS- dimetüülsulfonaat

dsDNA- kaheahelaline DNA

GGR- *global genome repair*

Glc- glükoos

GO- oksüdeeritud guaniin

H_2O_2 - vesinikperoksiid

Km- kanamütsiin

Lac- laktoos

LP-BER- pika ulatusega BER (*long-patch BER*)

MeI- metüüljodiid

MMR- DNA paardumisvigade reparatsioon (*mismatch repair*)

MMS- metüülmetaansulfonaat

MNNG- *N*-metüül-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidiin

MNU- *N*-metüülnitrosouurea

NER- nukleotiidi väljalõike reparatsioon (*nucleotide excision repair*)

N^1 -meA- N^1 -metüüladeniin

N^3 -meA- N^3 -metüüladeniin

N^3 -meC- N^3 -metüültsütosiin

N^3 -meG- N^3 -metüülguaniin

N^7 -meG- N^7 -metüülguaniin

O⁶-Cl-etüülG- O⁶-kloroetüülguaniin
O⁶-meG- O⁶-metüülguaniin
O⁴-meT- O⁶-metüültümiin
Phe- fenool
Pol- polümeraas
ppGpp- guanosiintetrafosfaat
pppGpp- guanosiinpentafosfaat
Rif- ripampitsiin
SAM- S-adenosüülmetioniin
Sm- streptomütsiin
SP-BER- lühikese ulatusega BER (*short-patch* BER)
ssDNA- üheaahelaline DNA
TCR- *transcription-coupled repair*
Tet- tetratsükliin
UV- ultraviolet

SISSEJUHATUS

Looduses on mikroorganismide kasv limiteeritud, kuna keskkonnatingimused on enamasti ebasoodsad. Põhilised kasvu limiteerivad tegurid on ebasoodne temperatuur, pH ja osmolaarsus. Samuti on piiratud toitainete kättesaadavus. Seega ei saa bakterid looduses piiramatult paljuneda ning on enamasti mittejagunevas ehk statsionaarses faasis. Limiteeritud keskkonnatingimused suudavad üle elada bakterid, kes on võimelised piisavalt kiiresti kohanema olemasolevate keskkonnatingimustega. Niisiis toimub looduses bakterite suhteliselt kiire evolutsioneerumine, kus ülekaalu saavutavad kiiremini kohanevad mutandid. Mutatsioone võivad põhjustada näiteks keskkonnas leiduvad DNA-d kahjustavad kemikaalid ja kiirgus. Lisaks tekib bakteriraku enda loomuliku elutegevuse käigus metabolismi kõrvalproduktidena reaktiivseid hapniku- ja alküülühendeid, mis on võimelised DNA-d modifitseerima. Teatud mutatsioonisagedus võib olla kasulik ja aidata kohaneda, kuid kui mutatsioonisagedus on liiga kõrge, kuhjuvad kahjulikud mutatsioonid mis võivad olla rakule letaalsed. Selleks, et toime tulla erinevate DNA kahjustustega, on bakteritel välja kujunenud mitmeid DNA reparatsioonisüsteeme, et tekkinud vead parandada. Samuti on neil olemas vigaderohked DNA polümeraasid, mis on võimelised sünteesima üle DNA kahjustuste ja seetõttu replikatsioon ei peatu, vaid viiakse lõpuni.

Kasvavates bakterites ja statsionaarses faasis olevates bakterites tekivad mutatsioonid erinevate mehhanismide järgi. Statsionaarses faasis kuhjuvad DNA kahjustused, mis võivad põhjustada mutatsioonide teket juhul kui neid ära ei parandata. Kuna looduslikud elutingimused on enamasti ebasoodsad, on oluline mõista statsionaarse faasi mutatsioonide tekkemehhanisme. Minu töö eesmärgiks oli uurida, kuidas mõjutab DNA alküülkahjustuste reparatsioonil osaleva alküültransferaasi sarnast valku (ATL) kodeeriva geeni *atl* defektsus mutatsioonide teket bakteris *Pseudomonas putida* ning kas ATL olemasolul või puudumisel on mõju nukleotiidi väljalõike reparatsioonirajale mutatsiooniprotsessides.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. DNA kahjustused

Kuna bakterid on oma looduslikus elukeskkonnas enamasti statsionaarses faasis, siis kuhjuvad neis DNA kahjustused, mis järgmise replikatsioonitsükliga kinnistuvad mutatsioonidena. DNA kahjustused tekivad endogeenselt organismi normaalse elutegevuse käigus ja eksogeenselt väliste keskkonnategurite mõjul. Endogeenseid DNA kahjustusi põhjustavad põhiliselt reaktiivsed hapnikuradikaalid ja alküülivad ühendid ja vähemal määral ka spontaanne lämmastikaluste eemaldamine ja deamineerimine. Eksogeenseid DNA kahjustusi põhjustavad näiteks ultraviolettkiirgus, ioniseeriv kiirgus ja keskkonnas leiduvad kemikaalid (Krwawicz jt., 2007; Shrivastav jt., 2010).

Endogeense päritoluga DNA kahjustusi tekib suurema sagedusega kui eksogeensete tegurite poolt põhjustatud kahjustusi (Jackson ja Loeb, 2001). Kahjustused, mis tekivad raku normaalse elutegevuse käigus, on identsed või väga sarnased neile, mida põhjustavad mõned keskkonnas esinevad DNA-d kahjustavad ained (Jackson ja Loeb, 2001; Krwawicz jt., 2007). Muutustele DNA-s viivad näiteks radiatsioon, hüdroolüüs, tundlikkus reaktiivsetele hapniku- ja lämmastikuühenditele ja teistele reaktiivsetele ühenditele, nagu alküülivad ained ja lipiidide peroksüdatsiooni saadused (Lindahl, 1993; Drablos jt., 2004; Tudek jt., 2007; Olinski jt., 2007; Krwawicz jt., 2007). DNA lämmastikalused adeniin, guaniin, tsütosiin ja 5-metüültsütosiin on alati spontaanse hüdroolüütilise deaminatsiooni käigus muutuma vastavalt hüpoksantiiniks, ksantiiniks, uratsiiliks ja tümiiniks. Deaminatsiooni esineb sagedamini üksikahelalises kui kaheahelalises DNA-s, kuna kaheahelaline DNA on kaitstud vesiniksidemetega (Krwawicz jt., 2007).

Selleks, et erinevate kahjustustega toime tulla ja ühtlasi ka kindlustada DNA stabiilsus ja genoomi kaitse potentsiaalsete ja mutageensete muutuste eest, on organismidel välja kujunenud mitmeid kahjustuste vältimise ja parandamise süsteeme. Erinevate kaitsemehhanismide koostoimel tagatakse geneetilise informatsiooni säilimine järglaskonnas tema algsel kujul.

1.1.1. Alkүүлivad ühendid

Alkүүлivad ained on grupp reaktiivseid kemikaale, mis kannavad oma alküülrühma (metüül- või etüülrühma) hapniku või lämmastiku aatomile DNA-s (Shrivastav jt., 2010). Alkүүлivad ained võivad DNA lämmastikalustega reageerida kaheteistkümnes erinevas kohas, kõikide lämmastikaluse rõngaväliste hapniku aatomitega ja enamike lämmastiku aatomitega. Samuti võivad alkүүлivad ühendid metüleerida hapnikku suhkur-fosfaadi selgroos, tekitades metüülfosfotriestreid (Sedgwick, 2004). Seega on alkүүлivad ühendid võimelised tekitama suure hulga erinevaid DNA kahjustusi, olles sageli tugevalt tsütotoksilised või mutageensed (Sedgwick ja Lindahl, 2002).

Alkүүлivaid ühendeid leidub näiteks õhus, toidus, vees ja tubakasuitsus, kuid nad tekivad ka taimse materjali kõdunemisel ja biomassi põlemisel (Sedgwick, 2004; Fu jt., 2012). Alkүүлivad ühendid võivad tekkida ka endogeenselt nii prokarüootses kui ka eükarüootses rakus metabolismi kõrvalsaadustena. Üheks selliseks ühendiks on näiteks *S*-adenosüülmetsioniin (*S-Adenosyl methionine*, SAM). Igapäevaselt kasutatakse alkүүлivaid ühendeid vähivastases kemoterapias (Sedgwick jt., 2007). Olenevalt reaktsioonimehhanismist on alkүүлivad ained jagatud kahte rühma: S_N1 ja S_N2 tüüpi ained. S_N1 tüüpi ained alkүүлivad nukleiinhapetes nii hapniku kui ka lämmastiku aatomeid, S_N2 tüüpi ained alkүүлivad põhiliselt lämmastiku aatomeid (Krwawicz jt., 2007). Enamlevinud laboris kasutatavaid S_N1 reaktsioonimehhanismi järgi reageerivaid aineid on *N*-metüül-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidiin (MNNG) ja *N*-metüülnitrosourea (MNU). Levinuimad S_N2 tüüpi ühendid on metüülmetaansulfonaat (MMS), dimetüülsulfonaat (DMS) ja metüüljodiid (MeI) (Sedgwick ja Lindahl, 2002). S_N2 tüüpi alkүүлivad ained modifitseerivad peamiselt puriini ja pürimidiini rõngas olevaid lämmastiku aatomeid, S_N1 tüüpi ühendid aga on võimelised alküülma nii lämmastiku kui ka rõngaväliseid hapniku aatomeid DNA-s (Sedgwick ja Lindahl, 2002). Eraldi grupp alkүүлivaid S_N1 tüüpi ühendeid on veel kloroetüleerivad ained, millede alküülgrupiga on seotud lisaks ka kloori molekul (Fu jt., 2012).

Lisaks võib alkүүлivaid aineid jagada reaktiivsete alküülgruppide arvu järgi monofunktsionaalseteks ja bifunktsionaalseteks. Monofunktsionaalsetel ühenditel on üks reaktiivne alküülgrupp ja nad on võimelised modifitseerima üht kohta DNA lämmastikaluses, samas kui bifunktsionaalsetel ühenditel on kaks reaktiivset alküülgruppi, millega nad on võimelised muutma kahte lähestikku asuvat DNA lämmastikalust, soodustades sellega ahelatevaheliste ristsidemete teket (Fu jt., 2012).

1.1.2. DNA alküülkahjustused

DNA metülatsiooniga on rakus reguleeritud mitmed erinevad protsessid. Näiteks eristatakse bakteris *Escherichia coli* DNA paardumisvigade reparatsioonisüsteemis (*mismatch repair*, MMR) DNA metülatsiooni järgi vana DNA ahelat äsjasünteesitud ahelast (uus ahel on veel metüleerimata). Samuti on bakterite DNA-s restriksioonisaadid metüleeritud selleks, et restriktasid raku enda DNA-d ära ei degradeeriks. Metülatsiooniga reguleeritakse veel transkriptsiooni ja replikatsiooni initsiatsiooni, metülatsioon mõjutab DNA-valgu interaktsioone ja lisaks tagab DNA termodünaamilise stabiilsuse (Jeltsch, 2002; Kumar ja Rao, 2012). Rakus aset leidev loomulik metülatsioon on küll eluliselt vajalik protsess, kuid erineb keemilisest metüleerimisest, mida teevad alküülivad ained ja mis põhjustavad DNA-s mutatsioonide teket (Jeltsch, 2002).

Alküülkahjustused võivad olla nii tsütotoksilised kui ka mutageensed (Sedgwick ja Lindahl, 2002). Alküülivate ainete tekitatud kahjustuste muster sõltub alküüliva aine reaktiivsete gruppide arvust (mono- ja bifunktsionaalsed), alküülreaktsiooni tüübist (S_N1 ja S_N2 reaktsioonimehhanismi järgi reageerivad ained), alküülgrupi tüübist (metüül-, etüül-, kloroetüül grupp jne) ja DNA substraadist (ühe- või kaheaahelaline DNA) (Fu jt., 2012).

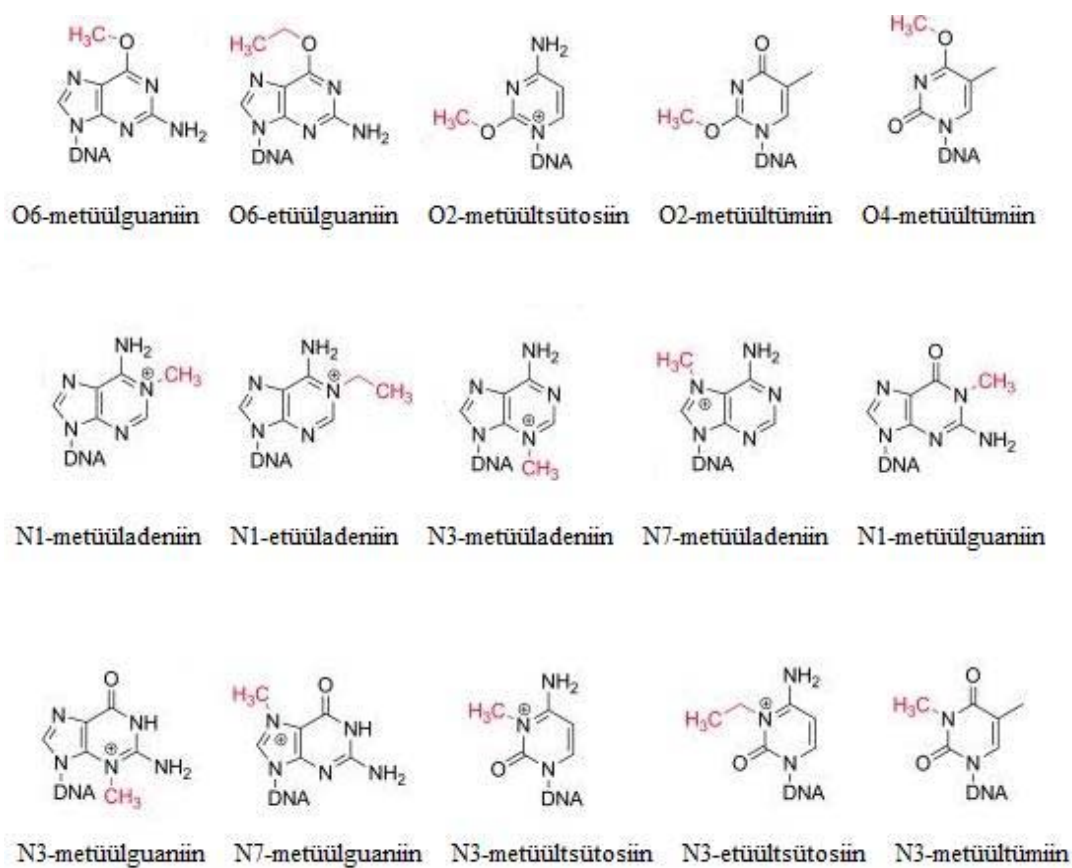
Põhilised alküülkahjustused kaheaahelalises DNA-s on N^7 -metüülguaniin (N^7 -meG) (60-80% kõikidest alküülkahjustustest), N^3 -metüüladeniin (N^3 -meA) (10-20% kõikidest alküülkahjustustest) ja O^6 -metüülguaniin (O^6 -meG) (joonis 1) (Sedgwick ja Lindahl, 2002; Fu jt., 2012). Üksikahelalises DNA-s tekivad sagedamini N^1 -metüüladeniin (N^1 -meA) ja N^3 -metüülsütosiin (N^3 -meC) (Sedgwick ja Lindahl, 2002). Kaksikahelalises DNA-s viimatinimetatud kahjustusi väga palju ei teki, kuna reageerida võivad kohad DNA lämmastikalustes on seotud DNA aluste paardumisega ning seetõttu kahjustuste eest kaitstud (Sedgwick 2004). Siiski võivad adeniini esimese positsiooni ja tsütosiini kolmanda positsiooni lämmastiku aatom ka kaksikahelalises DNA-s kahjustatud saada replikatsiooni, transkriptsiooni ja rekombinatsiooni ajal, mil DNA on ajutiselt üheaahelaline (Fu jt., 2012). N^7 -meG kahjustust tekib nii suure sagedusega seepärast, et N^7 positsioonis guaniin DNA-s on nukleofiilselt väga reaktiivne ja seega enamustele monofunktsionaalsetele alküülivatele ühenditele atraktiivne (Fu jt., 2012).

N^7 -meG kahjustus ise on suhteliselt ohutu, ta ei ole ei tsütotoksiline ega ka mutageenne (Fu jt., 2012). N^1 -meA, N^3 -meA, N^3 -meG ja N^3 -meC aga peatavad DNA replikatsiooni ja on seega väga tsütotoksilised (Sedgwick ja Lindahl, 2002; Fu jt., 2012). Samas leidub ka alküülkahjustusi, mis DNA replikatsiooni peatumist ei põhjusta, ent

tekitavad valepaardumisi, olles seega väga mutageensed. Bioloogiliselt olulised on seega näiteks O^4 -metüültümiin (O^4 -meT) (joonis 1) ja O^6 -meG (Sedgwick ja Lindahl, 2002). O^6 -meG valepaardumine tümiiniga põhjustab GC>AT transitsioone (Sedgwick, 2004). O^4 -meT põhjustab peamiselt AT>GC transitsioone (Preston jt., 1986).

Lisaks on näidatud, et keskkonnas leiduvad mutageenid 1,2-dimetüülhüdrasiin, *tert*-butüülhüdperoksüdaas ja diasokinoon tekitavad metüülradikaale, mis omakorda reageerivad guaniiniga DNA-s, mille tulemusena moodustub 8-metüülguaniin (Sedgwick ja Lindahl, 2002).

Kloroetüleerivad ühendid põhjustavad O^6 -kloroetüülguaniini (O^6 -Cl-etüülG) teket, mis on võimeline keemilise ümberkorralduse käigus reageerima läheduses oleva tsütosiiniga, põhjustates nii guaniin-tsütosiin ristsideme teket, mis omakorda peatab DNA replikatsiooni ja on seetõttu tsütotoksiline (Fu jt., 2012).



Joonis 1. DNA alküülkahjustuste struktuurid. Muudetud kujul artiklist Shrivastav jt., 2010.

1.1.3. Raku vastus DNA kahjustustele

Genoomne DNA on pidevalt eksponeeritud erinevatele DNA kahjustusi tekitavatele kemikaalidele (nii ekso- kui endogeensetele) ja kiirgusele. Kui DNA kahjustusi ära ei parandata, kinnistuvad nad järgmise replikatsioonitsükli käigus mutatsioonidenä (Krwawicz jt., 2007). Mutatsioonide vältimiseks on rakkudes välja kujunenud mitmeid erinevaid reparatsioonisüsteeme. Järgnevalt vaatleme põhilisi DNA reparatsioonisüsteeme.

Reparatsioonisüsteeme võib jagada kahte klassi: esimesse klassi kuuluvad reparatsioonisüsteemid eemaldavad otseselt DNA kahjustusi, teise klassi kuuluvad aga reparatsioonisüsteemid, mis eemaldavad esmalt kogu kahjustatud ala või lämmastikaluse ja seejärel sünteesitakse uus DNA fragment. Otseselt parandavad DNA-d näiteks metüültransferaasid ja fotolüaasid. Fotolüaasid eemaldavad ultraviolettkiirgusest tekitatud tsütosiini ja tümiini dimeere. (Posnick ja Samson, 2001). Metüültransferaasid eemaldavad alküülkahjustusi, kandes kahjustuselt alküülgrupi enda aktiivtsentrisse, ise seejärel inaktiveerudes ja taastades nii normaalse DNA lämmastikaluse (Sedgwick, 2004).

Teise reparatsioonisüsteemide klassi kuuluv lämmastikaluse väljalõike reparatsioonisüsteem (*base excision repair*, BER) tegeleb mitmete erinevate kahjustustega: oksüdatiivsed DNA kahjustused, alküülkahjustused ja deaminatsioon (Zharkov, 2008). DNA paardumisvigade reparatsioonisüsteem eemaldab replikatsioonil tekkinud valepaardumisi, mõnenukleotiidilisi insertioone ja deletsioone, mis pole DNA replikatsiooni ajal replikatiivse DNA polümeraasi eksonukleaaaside 3' – 5' suunalise aktiivsuse abil ära parandatud (Modrich ja Lahue, 1996). Lisaks takistab MMR homeoloogilise rekombinatsiooni toimumist, takistades nii võõr-DNA lülitumist bakteri genoomi (Kunkel ja Erie, 2005). Nukleotiidi väljalõike reparatsioon (*nucleotide excision repair*, NER) eemaldab suuri DNA kahjustusi, mis põhjustavad DNA konformatsioonilisi muutusi (van Hoffen jt., 2003). Prokarüootides eemaldab NER 12-13 nukleotiidi pikkuseid ja eükarüootides 24-32 nukleotiidi pikkuseid DNA lõike (Reardon ja Sancar, 2005).

Ühe- ja kaheaahelaliste katkete parandamiseks kasutatakse homoloogilist rekombinatsiooni. Homoloogiline rekombinatsioon on konserveerunud DNA reparatsioonimehhanism kõikides elusorganismides, mille käigus toimub sarnaste või identsete DNA piirkondade vahetus DNA molekulide vahel, kus matriitsina kasutatakse kahjustamata DNA molekuli (Lanka ja Pansegrau, 1999; Nowosielska, 2007). Lisaks on homoloogiline rekombinatsioon oluline ka lagunenud replikatsioonikahvlite taastamisel (Ivančić-Baće jt., 2002).

Samuti on bakteritel olemas vigaderohked DNA polümeraasid, mis on võimelised sünteesima üle DNA kahjustuste, ent teevad seda vigaderohkelt (Yang, 2003). Kahjustuste ületamine on võimalik, kuna vigaderohketel DNA polümeraasidel puudub 3' – 5' suunaline eksonukleasne vigu korrigeeriv aktiivsus ning aktiivtsentri struktuur võimaldab mahutada kahjustatud nukleotiide (Nohmi, 2006; Bjedov jt., 2007). Tänu vigaderohketele DNA polümeraasidele replikatsioon ei peatu kahjustuste korral, vaid viiakse lõpuni (Bjedov jt., 2007). Järgmistes peatükkides kirjeldan täpsemalt eespool mainitud DNA reparatsiooniradu.

1.2. DNA reparatsioon bakterites

1.2.1. DNA paardumisvigade reparatsioonisüsteem (MMR)

DNA paardumisvigade reparatsioonisüsteem (*mismatch repair*, MMR) on väga laialt levinud reparatsioonisüsteem, esinedes kõikides elusorganismides (Jun jt., 2006). MMR-il on väga oluline roll genoomi stabiilsuse säilitamisel, kuna see reparatsioonisüsteem eemaldab nii replikatsiooni käigus tekkinud valepaardumisi kui ka mõnenukleotiidilisi insertioone ja deletsioone (Modrich ja Lahue, 1996; Jun jt., 2006). Lisaks takistab MMR homeoloogilist rekombinatsiooni, vältides seetõttu võõr-DNA lülitamist bakteri genoomi (Kunkel ja Erie, 2005).

Bakteris *E. coli* osalevad MMR rajas valgud MutS, MutL, MutH ja UvrD. Reparatsioonirada algab MutS valgu seondumisega kahjustatud DNA-le (Jun jt., 2006). Pärast MutS valgu seondumist DNA kahjustusele seondub MutS-iga MutL valk, mis initsieerib MutH endonukleasne aktiivsuse (Kunkel ja Erie, 2005). MutH on tüüp II restriksiooniline endonukleas, mis teeb üheaahelalise lõike DNA GATC järjestusse valepaardumisest 3' või 5' suunas (Jun jt., 2006). Äsjasünteesitud DNA ahel tuntakse ära DNA metülatsiooni järgi. Nimelt on värskelt sünteesitud DNA ahel veel metüleerimata (Modrich ja Lahue, 1996). MutH valgu tekitatud lõige on signaaliks UvrD valgule. UvrD on DNA helikaas II, mis keerab valepaardumist sisaldava ahela lahti ning seejärel degradeerib ahela mõni 3' või 5' suunalistest eksonukleasidest. Tekkinud üksikahelalise regiooni sünteesib täis DNA polümeraas III ja DNA ahelate otsad ühendab DNA ligaas (Kunkel ja Erie, 2005; Jun jt., 2006).

1.2.2. Nukleotiidi väljalõike reparatsioonisüsteem (NER)

Nukleotiidi väljalõike reparatsioon (*nucleotide excision repair*, NER) on üks olulisemaid DNA reparatsioonisüsteeme, mis parandab erinevat tüüpi DNA kahjustusi, mida on tekitanud mitmed erinevad kemikaalid ja kiirgus (Reardon ja Sancar, 2005). NER eemaldab suuri, DNA konformatsiooni muutvaid kahjustusi (van Hoffen jt., 2003). Prokarüootides eemaldab NER 12-13 nukleotiidi pikkuseid DNA alasid ja eukarüootides 24-32 nukleotiidi pikkuseid DNA kahjustust sisaldavaid lõike (Reardon ja Sancar, 2005). NER koosneb viiest põhilisest etapist:

1. DNA kahjustuse äratundmine
2. üksikahelalise lõike tegemine kahjustatud ala mõlemale poole
3. kahjustust sisaldava üksikahelalise DNA fragmendi eemaldamine
4. väljalõigatud ala uuesti täissünteesimine
5. vana DNA ahela ja uuesti sünteesitud fragmendi otste ligeerimine (van Hoffen, 2003).

Bakteris *E. coli* algab NER kahjustuse äratundmisega. ATP-sõltuva reaktsiooni käigus moodustub UvrA₂B heterotrimeer, mille ülesandeks ongi kahjustuse detekteerimine. Kui kahjustus on identifitseeritud, siis UvrA dimeer aitab UvrB-l tugevalt kahjustatud kohale seonduda ja seejärel eemaldub ise UvrB-st. Järgnevalt seondub DNA-seoselisele UvrB valgule UvrC valk. Kui UvrC on seondunud, teeb UvrC DNA ühte ahelasse kahjustusest 3' ja 5'suunda lõiked ning seejärel eemaldab UvrD (heliikaas II) kahjustust sisaldava DNA lõigu, jättes muidu kaksikahelalisse DNA-sse üksikahelalise tühimiku. Tühimiku sünteesib täis DNA polümeraas I ja uuesti sünteesitud DNA ahela otsad ühendab vana DNA-ga DNA ligaas (Petit ja Sancar 1998; Posnick ja Samson, 2001; Grossman ja Kovalsky, 2001; Reardon ja Sancar, 2005).

NER-il on kaks alarada: globaalne genoomi reparatsioon (*global genome repair*, GGR) (kirjeldatud eelnevalt) ja aktiivsele transkriptsioonile spetsialiseerunud rada (*transcription-coupled repair*, TCR). TCR rada eksisteerib eukarüootides ja bakterites, kuid mitte arhedes (Deaconescu jt., 2012). TCR on väga oluline transkriptsiooni peatumist põhjustavate kahjustuste eemaldamisel, kuna sellised kahjustused on letaalsed (van Hoffen jt., 2003). Kõik valgud, mis osalevad globaalses NER rajas, osalevad ka TCR-is (Savery, 2007). Lisaks osaleb TCR rajas valk Mfd (tuntud ka kui TRCF- *Transcription Repair Coupling Factor*, *mfd* geeni produkt), mis on väga konserveerunud bakteriaalne valk. Mfd ülesandeks on ära tunda DNA kahjustuse tõttu seiskunud RNA polümeraas ja eemaldada see DNA-lt (Sirvastava ja Darst, 2011). TCR parandab kahjustusi, mis takistavad RNA polümeraasi tööd

transkriptsiooni elongatsioonifaasi ajal. Transkriptsiooni ajal on DNA ahelad üksteisest lahutatud. Transkribeeritakse vaid ühte ahelat, mis läbib RNA polümeraasi aktiivtsentri ning kui sinna peaks sattuma suuremahuline või mittekodeeriv kahjustus, siis RNA polümeraas peatub ja kutsutakse esile TCR (Savery, 2007). Kui RNA polümeraas detekteerib DNA kahjustuse, liigub ta nukleotiidi võrra tagasi ja temaga seondub Mfd valk, mis eemaldab RNA polümeraasi DNA-lt (Deaconescu jt., 2012). Mfd interakteerub UvrA valguga. Nüüd on võimalik UvrA₂B kompleksil DNA kahjustusega seonduda (eelnevalt kaitses kahjustust RNA polümeraas). Kui UvrA₂B kompleks on DNA-ga seondunud, siis UvrA dimeer eemaldub ja UvrB-DNA kompleksiga seondub UvrC valk. Seejärel tehakse lõige mõlemale poole kahjustatud regiooni, kahjustust sisaldava üheaheelalise DNA lõigu eemaldab UvrD helikaas ja uue fragmendi sünteesib DNA polümeraas I ning DNA ahelate otsad ühendab DNA ligaas (Roberts ja Park 2004; Savery, 2007; Deaconescu jt., 2012).

Mõnedes bakterites nagu näiteks *Xanthomonas axanopodis* (Shen jt., 2007), *Deinococcus radiodurans* (White jt., 1999) ja ka *P. putidas* (Tark jt., 2008) on lisaks leitud veel valk UvrA₂, mille täpne funktsioon on teadmata, ent oletatakse, et ta võib mõjutada UvrBC endonukleaasi kompleksi seondumist DNA-ga (Tark jt., 2008). Bakteris *D. radiodurans* osaleb UvrA₂ kahjustatud DNA rakust välja eksportimisel (White jt., 1999).

1.2.3. Lämmastikaluste väljalõike reparatsioon (BER)

Lämmastikaluste väljalõike reparatsioonisüsteem (*base excision repair*, BER) on samuti üks oluline DNA reparatsioonirada, mis tegeleb mitmete erinevate kahjustustega: oksüdatiivsed DNA kahjustused, alküülkahjustused ja deaminatsioon (Kairpun ja Scott, 2007; Zharkov, 2008). BER raja ensüüme on leitud kõikidest elusorganismidest bakterist inimeseni (Posnick ja Samson, 2001). BER raja algatavad DNA glükosülaasid, ensüümid, mis tunnevad ära spetsiifilise kahjustatud DNA aluse ja eemaldavad selle (Fromme jt., 2004). Glükosülaasid hüdrolüüsivad N-glükosiidsideme kahjustatud DNA aluse ja suhkrufosfaadi selgroo vahelt (Posnick ja Samson, 2001). Eemaldatud lämmastikaluse kohale jääb AP koht (ilma lämmastikaluseta koht, apuriinne/apürimidiinne koht). AP kohta protsessivad edasi AP endonukleaasid, mis lagundavad 5' fosfodiestersideme AP kohas, et alles jääks 3'-OH ja 5'-deoksüriboos fosfaat (5' blokeeritud ots). Lõpuks sünteesib tühimiku täis DNA polümeraas I ja otsad ühendab DNA ligaas (Zharkov, 2008; Kanamitsu ja Ikeda, 2010).

BER võib parandada palju erinevaid kahjustatud DNA lämmastikaluseid. Kuid

protsessis ei osale mitte üks, vaid mitmed erinevad DNA glükosülaasid, mis kõik on võimelised eemaldama erinevat tüüpi kahjustusi. Näiteks uratsiil DNA glükosülaasid eemaldavad uratsiili, mis on asendanud tsütosiini. 3'-metüüladeniini DNA glükosülaasid eemaldavad aga alküleeritud aluseid nagu 3-metüüladeniini, mida metüültransferaasid ei paranda (Posnick ja Samson, 2001).

BER-il on kaks alternatiivset rada: lühikese ulatusega BER (*short-patch* BER, SP-BER), mis asendab ühe nukleotiidi ja pika ulatusega BER (*long-patch* BER, LP-BER), mille käigus asendatakse mitu nukleotiidi (vähemalt 2, tihti 6-13 nukleotiidi asendus) (Krwawicz jt., 2007).

1.2.4. GO reparatsioon

Aeroobsetes bakterites tekib hingamisahela reaktsioonide ja oksüdatsiooniprotsesside käigus tihti reaktiivseid hapnikuühendeid (Messner ja Imlay, 2002), mis põhjustavad oksüdatiivseid DNA kahjustusi (Imlay, 2003). Nendeks on näiteks vesinikperoksiid H_2O_2 , superoksiidradikaal O_2^- ja hüdroksüülradikaal OH (Messner ja Imlay, 2002). Nad kahjustavad lämmastikaluseid ja suhkrujääke, tekitavad AP kohti, ühe-ja kaheaheelalisi DNA katkeid ning DNA-valk ristsidemeid (David-Cordonnier jt., 2000; Dizdaroglu, 2005). Üks sagedasemaid oksüdatiivseid DNA kahjustusi on 7,8-dihüdro-8-oksüguaniin (8-oksü-G või GO) (Mazurek jt., 2002).

Kuna 8-oksü-G on enimesinev oksüdatiivne DNA kahjustus, siis hakati seda kahjustust eemaldavaid BER glükosülaase käsitlema eraldi GO reparatsioonisüsteemina (Michaels ja Miller, 1992). Bakteris *E. coli* koosneb GO reparatsioonisüsteem valkudest MutY, MutM ja MutT (Michaels jt., 1992). MutM eemaldab DNA ahelast 8-oksü-G (Tchou jt., 1993). MutY eemaldab DNA-st nii guaniiniga kui ka 8-oksü-G-ga paardunud adeniini (Fromme jt., 2004) ja MutT hüdrolyüsib 8-oksü-G-dGTP-d (Maki ja Sekiguchi, 1992).

1.2.5. Homoloogiline rekombinatsioon

Homoloogiline rekombinatsioon on konserveerunud DNA reparatsioonimehhanism kõikides elusorganismides, mille käigus toimub sarnaste või identsete DNA piirkondade vahetus DNA molekulide vahel. See on üldiselt täpne mehhanism, kuna reparatsioonis kasutatakse matriitsina kahjustamata homoloogilist DNA molekuli. Bakteris *E. coli* parandatakse homoloogilise rekombinatsiooniga nii üksik- kui ka kaksikahelalisi DNA katkeid, mis on tekkinud kas normaalsete rakus toimuvate protsesside käigus või mille on põhjustanud raku väliskeskkonnast pärit kemikaalid (Lanka ja Pansegrau, 1999; Nowosielska, 2007). Bakterites võimaldab homoloogiline rekombinatsioon võõr-DNA inserteerumist, mis on sattunud rakku transformatsiooni või konjugatsiooni käigus, aidates nii kaasa horisontaalsele geeniülekannde (Rocha jt., 2005). Lisaks on homoloogiline rekombinatsioon oluline ka lagunenenud replikatsioonikahvlite taastamisel ja populatsiooni geneetilise varieeruvuse tagamisel (Ivančić-Baće jt., 2002).

Homoloogiline rekombinatsioon koosneb kolmest etapist, mis on ühetaoline nii prokarüootidel kui ka eukarüootidel: esimene etapp on presünaps, mille käigus tekitatakse üksikahelaline tühimik ning mille tulemusel on DNA valmis rekombinatsiooniks. Teises etapis ehk sünapsis, toimub füüsiline kontakt rekombinatsioonilise substraadi ja matriits-DNA vahel. Kolmandas etapis ehk postsünapsis lahutatakse rekombinatsioonilised vahevormid üksteisest (Kowalczykowski jt., 1994; Nowosielska, 2007).

Homoloogilise rekombinatsiooni initsiatsioonile võib bakteris *E. coli* järgneda RecBCD või RecFOR rada. Mõlema raja eesmärk on luua RecA molekulidega kaetud ssDNA selleks, et oleks võimalik homoloogilise DNA molekuli invasioon (Rocha jt., 2005). RecA valgul on DNA-sõltuv ATPaasne aktiivsus, ssDNA ja dsDNA seondumisaktiivsus, homoloogse DNA paardumisaktiivsus ja ahelate vahetamise aktiivsus (Nowosielska, 2007). RecBCD osaleb kaheahelaliste DNA katkete parandamisel ja RecFOR üheaahelaliste katkete parandamisel (Rocha jt., 2005). RecBCD raja valk RecB on nukleaas ja 3'-5' helikaas. RecD-l on samuti helikaasne aktiivsus ja ta keerab dsDNA lahti (küll aga 5'-3' suunas). RecC ülesandeks on DNA-d skaneerida ja ära tunda Chi järjestus: 5'-GCTGGTGG-3' (*crossover hotspot instigator*) (Nowosielska, 2007). RecBCD seondub dsDNA-le, keerab ahelad lahti, lagundab DNA-d kuni Chi saidini (Kowalczykowski, 2000). Seejärel toodetakse ssDNA, mille 3' otsa laetakse RecA valk. RecA leiab homoloogse järjestuse ja toimub DNA ahelate vahetus ning tekib Holliday struktuur. Holliday struktuur liigub mööda homoloogset piirkonda ja selle lõppedes lagundab Holliday struktuuri RuvC valk (Nowosielska, 2007).

RecFOR rada on vastutav üheahelaliste katkete parandamise eest ja koosneb valkudest RecF, RecO, RecR, RecJ ja RecQ. Kui üksikahelaline katke on tekkinud, siis RecQ ja RecJ alustavad ahelate lahtikeeramist ja lõhuvad ühe ahela. Seejärel seondub RecFOR valkude kompleks, mis laeb RecA valgu ning edasi läheb protsess edasi analoogselt RecBCD rajale (Nowosielska, 2007).

1.3. DNA alküülkahjustuste reparatsioon

Alküülivad ühendid kahjustavad DNA-s hapniku ja lämmastiku aatomeid, põhjustades laia spektri erinevaid alküülkahjustusi (Sedgwick ja Lindahl, 2002). Osa kahjustusi on suhteliselt kahjutud, samas kui mõned peatavad replikatsiooni ja on seega tsütotoksilised. Kõik alküülkahjustused küll replikatsiooni peatumist ei põhjusta, ent tekitavad siiski valepaardumisi, olles seega väga mutageensed (Sedgwick ja Lindahl, 2002; Fu jt., 2012). Selleks, et normaalne raku elutegevus saaks jätkuda, on oluline alküülkahjustuste reparatsioon.

DNA alküülkahjustuste eemaldamiseks on neli võimalikku rada. Esiteks metüültransferaasid ja oksüdatiivsed demetülaasid, mis võivad kahjustusi parandada otseselt. Teiseks võivad kahjustatud lämmastikaluste eemaldamisel osaleda BER raja glükosülaasid. Kolmas võimalus on kahjustatud nukleotiid eemaldada MMR reparatsioonisüsteemiga (Nieminuszczy ja Grzesiuk, 2007). Neljas võimalus alküülkahjustuste kõrvaldamiseks on NER reparatsioonirada, kus osaleb ka alküültransferaasi sarnane valk (ATL) (Tubbs ja Tainer, 2010; Onodera jt., 2010).

Metüültransferaasid on valgud, mis kannavad alküülkahjustatud lämmastikaluselt alküülgrupi endale, muutudes nii ise inaktiivseks. Metüültransferaase on leitud kõikidest elusorganismidest bakterist inimeseni (Posnick ja Samson, 2001). Bakteris *E. coli* on kaks DNA metüültransferaasi: Ada ja Ogt (Shrivastav jt., 2010). Ada valk kannab metüülgrupi otse oma sisemisele tsüsteiini jäägile, ise seejärel pöördumatult inaktiveerudes (Sedgwick, 2004). Igale Ada valgu molekulile on võimalik kanda üks metüülgrupp. Ada valk parandab O^6 -meG ja O^4 -meT kahjustusi ning hoiab ära G:C>A:T ja A:T>G:C transitsioone (Kleibl, 2002; Shrivastav jt., 2010). Ada valgu hulk *E. coli* rakus on vastavalt kahjustuste hulga ~ 1 -3000 molekuli. Bakteris *E. coli* on ka teine metüültransferaas, konstitutiivselt ekspresseeritav Ogt valk, mis eelistatult parandab O^4 -meT ja vähemal määral O^6 -meG kahjustusi. Ogt valku on rakus pidevalt ~ 30 molekuli (Shrivastav jt., 2010).

Ada valgul on ka võtmeroll adaptatiivse vastuse kujunemises, toimides lisaks reparatsiooniensüümile ka kui *ada*, *alkB*, *alkA* ja *aidB* geenide transkriptsiooni aktivaator (Shrivastav jt., 2010). Ada valk võib läbi teha konformatsioonilise muutuse ja seonduda spetsiifiliselt eelpool nimetatud geenide promootoritele (Kleibl, 2002; Sedgwick, 2004). Alküülivate ainete kontsentratsioon keskkonnas kõigub ning selleks, et hoida rakku stabiilselt nende ainete suhtes resistentsena, ongi bakterites välja kujunenud adaptatiivne vastus (Sedgwick ja Lindahl, 2002).

Teistest *ada* reguloni kuuluvatest valkudest on valk AlkB α -ketoglutarat-Fe(II)-sõltuv dioksügenaas, mis parandab üheaahelalises DNA-s N^1 -meA ja N^3 -meC kahjustusi oksüdatiivse demetülatsiooni kaudu (Sedgwick ja Lindahl, 2002). Bakteris *E. coli* on ka kaks BER raja DNA glükosülaasi, mis alküülkahjustusi parandavad: need on Tag (N^3 -metüüladeniin DNA glükosülaas I) ja AlkA (N^3 -metüüladeniin DNA glükosülaas II). Tag on väga kitsa substraadispetsiifikaga, parandades ainult N^3 -meA ja N^3 -meG kahjustusi. Seevastu AlkA eemaldab lisaks N^3 -meA ja N^3 -meG kahjustustele ka N^7 -meG, N^7 -meA, O^2 -alküülpürimidiin-, hüpoksaantiin-, 1- N^6 -eteenadeniin- ja 5-formüüluratsiil-kahjustusi (Krokan jt., 1997). Tag valku ekspresseeritakse konstitutiivselt, seevastu AlkA valku aga ekspresseeritakse siis, kui rakus suureneb alküülivate ainete kontsentratsioon, ehk osana adaptiivsest vastusest (Grzesiuk jt., 2001). Neljandast *ada* reguloni valgust AidB ei ole väga palju teada. Ta on valgujärjestuselt sarnane atsetüül-koensüüm A dehüdrogenaasiga (Bowles jt., 2008). AidB valk seondub kaheaahelalisele DNA-le ja on võimeline siduma alküülivaid ühendeid, kaitstes nii DNA-d. AidB valgu võimalikeks substraatideks on MMS ja MNNG (Hamill jt., 2012).

Alküülkahjustuste reparatsioonil osaleb ka alküültransferaasi sarnane valk (ATL), mis seondub alküülkahjustusele, eksponeerib kahjustust NER raja ensüümidele, mispeale NER alküülkahjustuse eemaldab (Tubbs ja Tainer, 2010; Onodera jt., 2010).

1.3.1. Alküültransferaasi sarnane valk (ATL)

Bakteris *E. coli* parandavad DNA O^6 -alküülguaniin kahjustusi enamasti alküültransferaasid Ada ja Ogt (Tubbs ja Tainer, 2010). 2003 aastal avastasid Marginson ja tema kaastöötajad prokarüootidest ja ainuraksetest eükarüootidest uue valgu, mis on alküültransferaaside homoloog. See on alküültransferaasi sarnane valk (*alkyltransferase-like protein*, ATL) (Marginson jt., 2003). ATL valgu katalüütilise domääni järjestus sarnaneb alküültransferaasi omaga (Marginson jt., 2007). ATL eksisteerib koos alküültransferaasidega mitmetes organismides, kuid paljudest organismidest ei ole ATL valku leitud (Marginson jt.,

2007). Enamik teadaolevatest ATL valkudest on pärit bakteritest (Tubbs ja Tainer, 2010). ATL valke on leitud ka mõningates seentes (Pearson jt., 2006) ja arhedes (Tubbs jt., 2009). Kõrgematest eukarüootidest ja taimedest ATL valke ei ole leitud (Marginson jt., 2007).

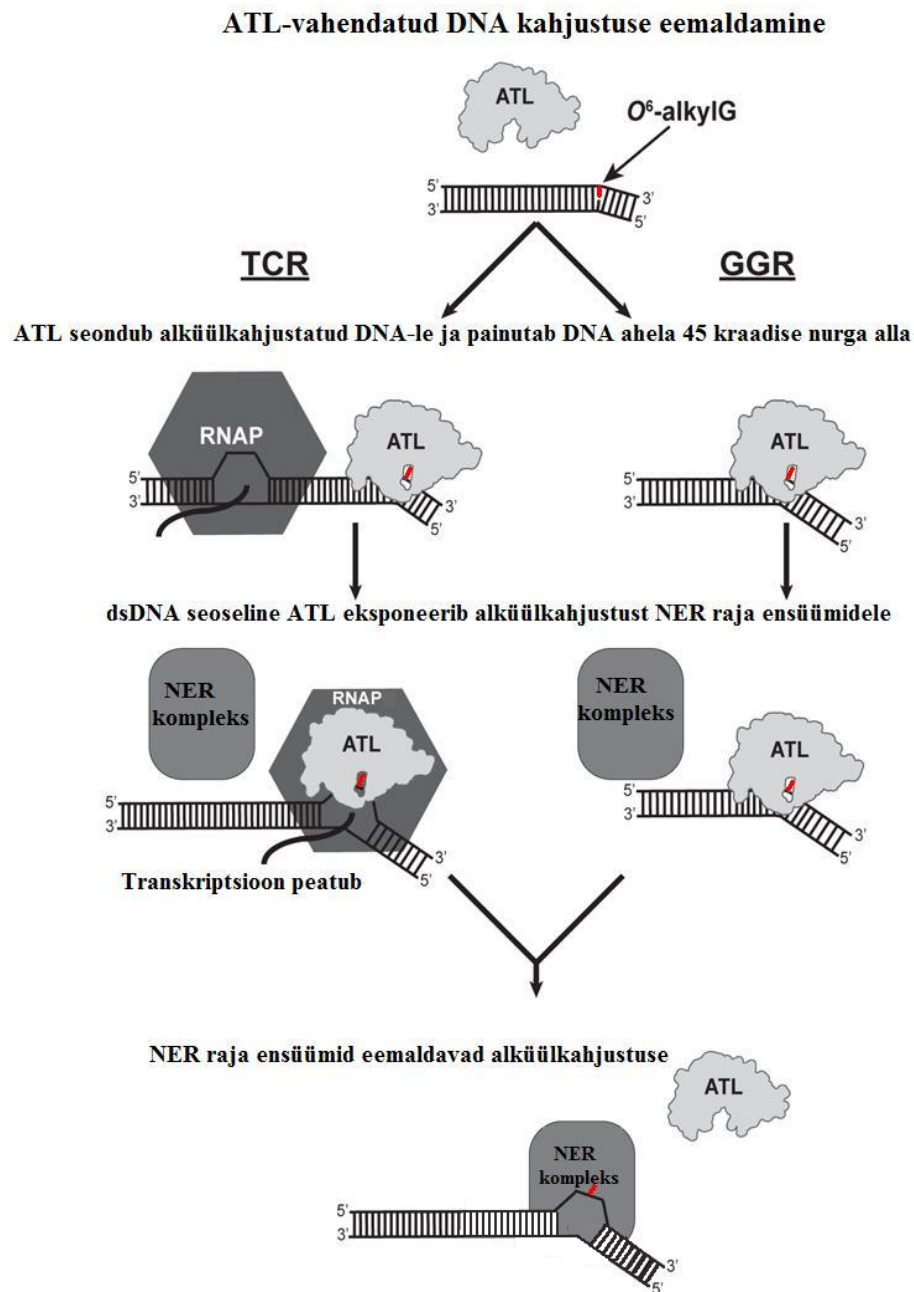
ATL on küll väga sarnane alküültransferaasidega, kuid tal on siiski olulisi erinevusi. Näiteks puudub ATL valgul alküültransferaasidele omane C-terminuses asuv reaktiivne tsüsteiini jääk, selle asemel on tal kas trüptofaan võialaniin (Reißner jt., 2009). Seega puudub tal ka alküültransferaasne aktiivsus, mida on näidatud nii pärmis *Schizosaccharomyces pombe* (Atl1) (Pearson jt., 2006), bakteris *E. coli* (eAtl, tuntud ka kui YbaZ) (Pearson jt., 2005) kui ka bakteris *Thermus thermophilus* (TTHA1564) (Morita jt., 2008). Trüptofaani võialaniini asendamine tsüsteiiniga ei taasta alküültransferaasset aktiivsust (Reißner jt., 2009). Lisaks sellele, et tal puudub alküültransferaasne aktiivsus, on bakteris *E. coli* näidatud, et tal ei ole alternatiivina ka ei glükosülaasset, demetülaasset ega ka endonukleaasset aktiivsust (Pearson jt., 2005). Kuigi ATL valgul katalüütilist aktiivsust ei ole, seondub ta siiski spetsiifiliselt alküleeritud DNA-le, inhibeerides nii pöördvalt alküültransferaasi tööd DNA reparatsioonil. ATL geeni inaktivatsioon suurendab tundlikkust alküülivatele ainetele, millest võib järeldada, et ta kaitseb siiski rakku alküülkahjustuste eest, olgugi, et tal puudub igasugune katalüütiline aktiivsus (Reißner jt., 2009). Tekib küsimus, et kuidas saab katalüütiliselt inaktiivne valk parandada DNA-d? On jõutud järeldusele, et ATL annab kahjustusest märku ja tal on oma osa NER rajal. Oletatavasti seondub ta DNA alküülkahjustusele ja eksponeerib kahjustust NER raja ensüümidele (Tubbs jt., 2009).

ATL valgu struktuuri uuringud on näidanud, et ATL-il ja alküültransferaasidel on vägagi identseid funktsionaalseid motiive, kuid ATL valgu DNA kahjustusi siduv avaus on kolm korda laiem kui alküültransferaasidel, mis võimaldab mahutada suuremaid kahjustusi (Tubbs jt., 2009). Lisaks, kui alküültransferaas seondub DNA-le, siis ta painutab seda 30 kraadi, ATL aga painutab DNA-d seondumisel 45 kraadi (joonis 2) (Tubbs jt., 2009).

Bakteris *E. coli* on olemas nii alküültransferaaside kui ka ATL geenid. *S. pombe*-l, *D. radiodurans*-il ja *T. thermophilus*-el aga alküültransferaaside geene ei ole, ent on ATL geenid (Onodera jt., 2010). ATL valgud seonduvad spetsiifiliselt O^6 -alküülguaniiniga (Tubbs ja Tainer, 2010). Atl1 seondub ssDNA-le, mis sisaldab O^6 -metüülguaniini, O^6 -bensüülguaniini, O^6 -(4-bromotenüül)guaniini või O^6 -hüdrosüülguaniini ja dsDNA-le, mis sisaldab O^6 -metüülguaniini või O^6 -4-(3-püridüül)-4-oksobutüülguaniini (Tubbs jt., 2009). On näidatud, et *T. thermophiluse* ATL valk (TTHA1564) interakteerub *in vitro* UvrA valguga, mis on NER reparatsiooniraja ensüüm (Morita jt., 2008). Bakteris *E. coli* on näidatud eAtl interaktsiooni nii UvrA kui ka UvrC valkudega (Reißner jt., 2009). Sellest võib järeldada, et ATL valk käitub

O^6 -metüülguaniin-kahjustuse sensorina ja värbab UvrA valku kahjustust parandama NER reparatsiooniraja kaudu (Onodera jt., 2010) (joonis 2).

ATL geeni inaktivatsioon suurendab tundlikkust alküülivatele ainetele (Reißner jt., 2009). MNNG indutseerib ATL geeni defektses *T. thermophiluse* tüves ja ATL UvrA geenide topeltdefektses tüves G:C>A:T transitsioonide teket, mis kinnitab ATL valgu ja NER reparatsiooniraja vahelist seost (Onodera jt., 2010).



Joonis 2. ATL-vahendatud DNA alküülkahjustuse eemaldamine. Muudetud kujul artiklist Tubbs ja Tainer, 2010.

1.4. Statsionaarse faasi mutagenees

1.4.1. Statsionaarse faasi mutatsioonide tekkemehhanismid

Bakterid peavad pidevalt kohastuma muutuvate keskkonnatingimustega. Looduskeskkonnas leidub harva tingimusi bakterite piiramatuks kasvuks, mistõttu enamasti bakterid jagunevad kas väga aeglaselt või ei jagune üldse ehk on statsionaarses faasis (Foster, 2007; Kivisaar, 2010). Sellistes kasvu piiravates tingimustes saavutavad edu bakterid, kellel on tekkinud mutatsioonid, mis võimaldavad selles keskkonnas ellu jääda ja kasvada. Mutatsioone, mis võimaldavad piiratud tingimustes ellu jääda, nimetatakse adaptatiivseteks ehk statsionaarse faasi mutatsioonideks (Foster, 1999).

Kuna enamus mutatsioone on kahjulikud, on elusorganismidel välja kujunenud mehhanismid, mis hoiavad mutatsioonisageduse nii madalal kui võimalik. Ajutiselt suurenenud mutatsioonisagedus võib olla aga kasulik, kuna aitab kohaneda ja ellu jääda. Bakterid reageerivad stressirohketele tingimustele, muutes geeniekspressiooni mustreid, kuniks stress on möödas (Foster, 2005).

Nii bakteris *E. coli* kui ka teistes bakterites on olemas laiahaardeline ja suure efektiivsusega vastus DNA kahjustustele, SOS vastus. Kui raku DNA on kahjustatud, tekivad üheaheelalised DNA regioonid. ssDNA tunneb ära ja seondub sellega bakteriaalne rekombinaas RecA, moodustades nukleoproteiinfilament-kompleksi. See kompleks stimuleerib LexA repressori autoproteolüüsi, mis põhjustab SOS geenide ekspressiooni, millest paljud kodeerivad ensüüme, mis stimuleerivad DNA reparatsiooni, rekombinatsiooni ja DNA sünteesi jätkumist replikatsiooni peatumise korral (Foster, 2005; Wade jt, 2005; Foster, 2007). Bakteris *E. coli* on kaks Y-perekonna DNA polümeraasi, mis on võimelised sünteesima üle DNA kahjustuste tänu 3'-5' suunalise eksonukleaase vigukorrigeeriva aktiivsuse puudumisele (Nohmi, 2006). Need on Pol IV, mida kodeerib geen *dinB* ja Pol V, mida kodeerib *umuDC* operon (Bjedov jt., 2007). Mõlemaid polümeraase represseerib LexA ja nad on indutseeritud osana SOS vastusest (Tegova jt., 2004; Foster, 2005).

Kui bakterid jõuavad statsionaarsesse kasvufaasi või kui on toitainete puudus, siis indutseeritakse „üldine stressivastus“. Seda kontrollib statsionaarse faasi sigma faktor RpoS, mis on tuntud ka kui σ^{38} . (Hengge-Aronis, 2002; Foster, 2007). RpoS suunab RNA polümeraasi statsionaarse faasi rakkudes aktiveeritavatele promootoritele. RpoS regulonis on üle 100 geeni ja enamus neist kodeerivad valke, mis aitavad mittekasvavatel rakkudel ellu jääda. RpoS-i peetakse üldise stressivastuse põhiliseks regulaatoriks (Foster, 2005). On teada

kaks viisi, kuidas RpoS-sõltuv üldine stressivastus suurendab spontaansete mutatsioonide tekkesagedust stressis rakkudes. Esiteks tõstab RpoS Pol IV hulka rakus. Bakteris *E. coli* tõuseb 10 tundi pärast statsionaarsesse faasi minekut Pol IV hulk rakus kolm korda (Layton jt., 2003; Foster, 2007). Teine viis, kuidas RpoS suurendab spontaansete mutatsioonide tekkesagedust, on MMR reparatsioonisüsteemi ensüümide allasurumine (MutS ja MutH, aga mitte MutL). Seega MMR töötab ebaefektiivsemalt ja kuna vead jäävad parandamata, siis mutatsioonisagedus tõuseb (Foster, 2005; Foster, 2007).

E. coli sigma faktor RpoH (σ^{32}) kontrolli alla kuulub umbes 30 geeni, mis aktiveeritakse „kuuma-shoki“ vastuse korral, kui temperatuur tõuseb üle optimumi või kui rakus ei toimu korrektset valkude kokkupakkimist (Foster, 2007). *groEL/ES* operon, mis kodeerib molekulaarset chaperoni GroE, on selle reguloni üks olulisemaid valke. Ta on vajalik igal temperatuuril ja vastutab valkude voltimise ja konformatsiooni püsimise eest (Foster, 2007). DNA Pol V hulk sõltub GroE-st, kuna chaperon interakteerub Pol V subühikuga ja kaitseb teda degradatsiooni eest. Järelikult RpoH aktiveerumisel suureneb Pol V hulk rakus ja seega suureneb ka mutatsioonisagedus (Layton jt., 2005; Foster, 2007).

Bakterid reageerivad aminohapete puudusele ja üldistele näljatingimustele, surudes alla stabiilse RNA (rRNA ja tRNA) sünteesi (Foster, 2005). Sellist reageerimist nimetatakse „poomisvastuseks“ (*stringet response*). Lisaks pärsitakse ka valgusünteesi ja aktiveeritakse aminohapete biosüntees (Foster, 2007). Poomisvastust vahendavad guanosiin nukleotiidid pppGpp ja ppGpp (koos tuntud ka kui (p)ppGpp) (Kanjee jt., 2012). (p)ppGpp reguleerib transkriptsiooni, seondudes RNA polümeraasile ja muutes tema transkriptsioonilist aktiivsust. (p)ppGpp reguleerib ka RpoS-i promootorit ja RpoS-ist sõltuvaid geene (Gentry jt., 1993; Kvint jt., 2000). Järelikult on „üldine stressivastus“ ja „poomisvastus“ osaliselt kattuvad ja koos indutseeritavad (Chang jt., 2002; Traxler jt., 2006). Kuna transkribeeritav DNA on üheaahelaline ja kahjustuste suhtes tundlikum, siis aminohapete biosünteesi geenide transkriptsioon põhjustab mutatsioonide teket (Foster, 2007). „Poomisvastuse“ indutseerimine põhjustab DNA replikatsiooni peatumist, oletatavasti selleks, et oodata toitainete piisava hulga taastumist (Gourse ja Keck, 2007). Erinevates bakterites toimub replikatsiooni peatamine erinevalt. Bakteris *E. coli* inhibeerib (p)ppGpp replikatsiooni initsiatsiooni (Schreiber jt., 1995). Bakteris *Bacillus subtilis* aga inhibeerib (p)ppGpp DNA replikatsiooni elongatsiooni (Autret jt., 1999). Lisaks seondub bakteris *B. subtilis* (p)ppGpp ka RNA primaasile, inhibeerides tema aktiivsust ja peatades nii replikatsioonikahvli liikumise. Pärast pikaajalist DNA replikatsiooni blokeerimist võib toimuda restart ja kui sellesse on kaasatud vigaderohked DNA polümeraasid, siis on see mutatsioonide allikaks (Wang jt., 2007).

1.4.2. Statsionaarse faasi mutagenees *E. coli* tüves FC40

Statsionaarse faasi mutatsioone on enim uuritud *E. coli* tüves FC40 (Foster ja Trimarchi, 1995). Sellel tüvel on kromosomaalne *lacZ* geen, mis kodeerib β -galaktosidaasi ja võimaldab kasutada süsinikuallikana laktoosi, deleteeritud (Cupples ja Miller, 1988). *E. coli* tüves FC40 on F' episoom, mis sisaldab *lacI-lacZ* liitjärjestust, mille *lacI* kodeerivasse alasse on tekitatud +1 raaminihkemutatsioon (Foster ja Trimarchi, 1995).

E. coli tüvi FC40 ei ole võimeline kasutama toiduks laktoosi (Lac^-), aga võime laktoosi kasutada taastub kergesti (Lac^+), kui laktoos on ainus süsinikuühend energiaallikana. Seepärast on FC40 kõige populaarsem *E. coli* tüvi statsionaarse faasi mutatsioonide tekkemehhanismide uurimiseks. Kaks päeva pärast FC40 rakkude plaatimist laktoosi minimaaltassile hakkavad ilmuma Lac^+ kolooniad konstantsel kiirusel 1 koloonia 10^7 raku kohta päevas (Foster, 1999). Esimesel kahel päeval ilmunud kolooniates on mutatsioonid tekkinud enne rakkude plaatimist kasvavas kultuuris. 90-95% Lac^+ revertantidest on aga mutatsioonid tekkinud pärast plaatimist süsinikunälja tingimustes (Foster ja Trimarchi, 1994). Lac^+ mutandid ei teki, kui FC40 rakke inkubeerida ilma süsinikuallikata, kuid ilmuvad kohe kui nälgivatele rakkudele lisada laktoosi. Seega arvati algul, et lihtsalt nälgimine ei põhjusta Lac^+ revertantide teket, mutatsioonide tekkeks on laktoos hädavajalik (Cairns ja Foster, 1991).

Mutatsioonid, mis on tekkinud selektsioonitingimustes nälgivates bakterites, erinevad Lac^+ mutatsioonidest, mis on tekkinud kasvavates rakkudes mitteselektsiooni tingimustes. Selektsooningimustes tekkinud mutatsioonid on peaaegu kõik ühe aluspaarilised deletsioonid. Kasvavates rakkudes tekivad aga lisaks deletsioonidele ka duplikatsioonid ja suuremad raaminihked (Cairns ja Foster, 1991; Rosenberg jt., 1994). Lac^+ revertantides, mis on tekkinud laktoosi selektsiooni tingimustes, tekivad mutatsioonid erineva mehhanismi järgi kui Lac^+ revertantides, mis on tekkinud kasvavates rakkudes. Ensüümid RecA, RecBCD ja RuvABC, mis osalevad rekombinatsioonil kaheaheelaliste katkete parandamisel, on vajalikud Lac^+ mutatsioonide tekkeks laktoosi minimaalsöötmetel nälgivates statsionaarse faasi rakkudes, kuid mitte kasvamise ajal (Cairns ja Foster, 1991; Foster, 1993; Foster jt., 1996; Harris jt., 1994; Harris jt., 1996). Selleks, et tekiksid Lac^+ revertandid FC40 tüves, peab *lac* alleel olema episoomis. Kui *lac* alleel on oma algses kohas kromosoomis, siis Lac^+ revertantide tekkesagedus langeb 100 korda ja ei sõltu enam rekombinatsiooni funktsioonist (Foster ja Trimarchi, 1995; Radicella jt., 1995). Lac^+ revertantide tekkeks on vajalik ka episoomi konjugatsiooni funktsioonid. Kui konjugatsiooni funktsioon on defektne, siis statsionaarse faasi mutatsioonide tekkesagedus langeb 10 korda, kuid on siiski kõrgem kui

rekombinatsiooni funktsioonide puudumisel (Foster ja Trimarchi, 1995).

50-80% Lac⁺ revertantides tekkinud mutatsioone on tekitanud DNA polümeraas IV (Foster, 2000; McKenzie jt., 2001). Pol II on samuti aktiivne, kuid ei põhjusta statsionaarse faasi mutatsioone (Foster ja Trimarchi, 1995). Pol V Lac⁺ mutatsioonide tekkes ei osale (Cairns ja Foster, 1991). Kui MMR reparatsioonirada on defektne, suureneb Lac⁺ revertantide tekkesagedus 100 korda (Foster ja Cairns, 1992). Lac⁺ revertantide teket soodustab lisaks ka sigma faktor RpoS, mis on DNA polümeraasi Pol IV positiivne regulaator (Layton ja Foster, 2003).

1.4.3. Spetsialiseeritud DNA polümeraaside osalus statsionaarse faasi mutageneesis

SOS vastus on üks võimalus, kuidas bakterid reageerivad DNA kahjustustele, milles osaleb bakteris *E. coli* üle 40 geeni. Kolm neist geenidest kodeerivad DNA polümeraase (Courcelle jt., 2001; Yang, 2003). DNA polümeraasid on ensüümid, mis sünteesivad matriits DNA-lt komplementaarse DNA ahela 5' – 3' suunas (Nohmi, 2006). Bakteris *E. coli* on 5 DNA polümeraasi: Pol I, Pol II, Pol III, Pol IV ja Pol V (Nohmi, 2006; Hastings jt., 2010). Kolm neist, Pol II, Pol IV ja Pol V, on spetsialiseeritud DNA polümeraasid, mis on indutseeritud SOS vastuse korral ja nad on võimelised sünteesima üle DNA kahjustuste (*translesion DNA synthesis*, TLS). TLS on aga vigaderohke ja seega põhjustavad spetsialiseeritud DNA polümeraasid mutatsioonide teket (Yang, 2003; Nohmi, 2006).

DNA polümeraas I, mida kodeerib bakteris *E. coli* *polA* geen, on A-perekonna DNA polümeraas (Nohmi, 2006). Pol I-l on kaks funktsionaalset domeeni: suur domeen (Klenow fragment), mis omab 5'>3' polümeraasset ja 3'>5' eksonukleaasset (*proofreading*) aktiivsust ning väike domeen, mis omab 5'>3' eksonukleaasset aktiivsust. 5'>3' eksonukleaasne aktiivsus võimaldab Pol I-l eemaldada Okazaki fragmentidest RNA praimerid. Lisaks osaleb Pol I DNA reparatsioonil ja rekombinatsioonil. DNA reparatsiooni ajal täidab Pol I DNA tühimikke, mis on tekkinud kahjustust sisaldava üksikahelaise DNA lõigu väljalõikega (Makiela-Dzvenska jt., 2009; Hastings jt., 2010).

DNA polümeraas II-te kodeerib bakteris *E. coli* *polB* geen ja ta kuulub B-perekonna DNA polümeraaside hulka (Hasting jt., 2010). Ta omab 5'>3' polümeraasset aktiivsust, 3'>5' eksonukleaasset (*proofreading*) aktiivsust, kuid tal puudub 5'>3' eksonukleaasne aktiivsus (Nohmi, 2006). Pol II osaleb DNA replikatsioonil, kus ta parandab mahajääval ahelal Pol III tekitatud vigu. Samuti osaleb Pol II DNA replikatsiooni restardil pärast DNA kahjustust

(Hastings jt., 2010). Pol II on indutseeritud osana SOS vastusest (Rangarajan jt., 1997). Ta osaleb ka TLS-is, põhjustades -2 raaminihke mutatsioone (Nohmi, 2006).

DNA polümeraas III-e kodeerib bakteris *E. coli* geen *polC* ja ta kuulub C-perekonna DNA polümeraaside hulka (Nohmi, 2006). Pol III viib läbi kromosoomi replikatsiooni nii juhtival kui ka mahajääval ahelal replikatsioonikahvlis (Mamun, 2007). Tema poolt läbiviidav DNA süntees on väga täpne, tehes vaid ühe vea 10000 nukleotiidi kohta (Ling jt., 2001). Pol III-e inaktivatsioon on bakteritele letaalne (Nohmi, 2006). Tal on 5'>3' polümeraasne aktiivsus ja 3'>5' eksonukleasne vigu korrigeeriv (*proofreading*) aktiivsus (Nohmi, 2006). Vigu korrigeeriv aktiivsus võimaldab Pol III-el eemaldada valesti paardunud nukleotiide (Makiela-Dzvenska jt., 2009).

DNA polümeraasid IV ja V kuuluvad Y-perekonna DNA polümeraaside hulka ja neid kodeerivad bakteris *E. coli* vastavalt geen *dinB* ja operon *umuDC*. Neil puudub 3'>5' eksonukleasne aktiivsus ja kuna nende aktiivtsenter on mahukam võrreldes Pol III aktiivtsentriga, võimaldab see neil sünteesida üle DNA kahjustuste (Bjedov jt., 2007). Replitseerides kahjustamata DNA-d, teevad Y-perekonna DNA polümeraasid vigu 10 kuni 100 korda rohkem kui Pol III (Ling jt., 2001). *dinB* geeni üleekspressioon tõstab spontaanste mutatsioonide tekkesagedust, põhjustades enamasti raaminihkeid ja asendusmutatsioone. Mittestressis *E. coli* rakus on ca 250 Pol IV molekuli, SOS vastuse korral aga tõuseb molekulide arv raku kohta kümme korda, mis on kõrgeim ekspressioonitase kõigist viiest *E. coli* DNA polümeraasist SOS vastuse korral (Nohmi, 2006). *dinB* geeni transkriptsioon on RpoS-i kontrolli all, mis reguleerib üldist stressivastust. Ka kuuma-shoki *chaperon* GroE reguleerib Pol IV ekspressiooni (Bjedov jt., 2007). Pol V on võimeline sünteesima üle UV-kiirguse tekitatud DNA kahjustuste, põhjustades sellega asendusmutatsioonide teket. Pol V põhjustab ka raaminihkemutatsioone. Mittestressis *E. coli* rakus on ca 15 Pol V molekuli, SOS vastuse korral tõuseb molekulide arv raku kohta 200-ni (Pham jt., 2001; Nohmi, 2006).

1.4.4. Statsionaarse faasi mutagenees bakteris *Pseudomonas putida*

Perekond *Pseudomonas* kuulub Gram-negatiivsete γ -proteobakterite hulka ning on äärmiselt mitmekülgne ja kohanemisvõimeline bakterite rühm (Nelson jt., 2002; Cornelis, 2010). Pseudomonaadid on ökoloogiliselt laialt levinud ja nende seas on nii taimede, putukate, nematoodide kui ka imetajate patogeene (Cornelis, 2010). *P. putida* elab mullas ja taimede juurtel (Ramos-Gonzalez, 2005) ja ta ei ole patogeenne (Pieper ja Reineke, 2000). *P. putida* on võime maha suruda mikrosteente paljunemist, kes on põllukultuuride patogeened,

produtseerides seenevastaseid antibiootikume ja sidudes siderofooride abil rauda, jättes teised mikroobid rauanälga (Haas ja Keel, 2003). Pseudomonaadidel on ka võime lagundada toksilisi orgaanilisi ühendeid, näiteks aromaatsid süsivesinikke (Timmis ja Pieper, 1999).

Pseudomonaadidel puuduvad kromosomaalsed Pol V geenid *umuD* ja *umuC*, kuid neil on nn „mutageneesigeenide klaster“, mis kodeerib DNA polümeraas III-e α -subühikut homoloogi DnaE2 ja Y-perekonna DNA polümeraaside homoloogi ImuB (Abella jt., 2004; Erill jt., 2006; Koorits jt., 2007), mis indutseeritakse DNA kahjustuste korral, nagu Pol V geenid *E. coli* puhul. *P. putida* rakkudes on see geeniklaster LexA2 repressori negatiivse kontrolli all (Abella jt., 2004). Kuid ImuB ja DnaE2 valkudel on vastupidine roll statsionaarse faasi mutageneesis (Koorits jt., 2007). Nimelt DnaE2 vähendab asendusmutatsioonide tekkesagedust ja tal ei ole 1-bp deletsioonide tekitamises erilist efekti, samas kui ImuB põhjustab nende mutatsioonide tekkesageduse tõusu. Selline ImuB ja DnaE2-e bioloogiline efekt *P. putida* mutageneesis erineb teistest organismidest, kellel on nende valkude homoloogid (Koorits jt., 2007).

P. putida tüves mt-2 on kirjeldatud TOL plasmiid pWW0, mis sisaldab tolueeni katabolismi geene ja *rulAB* geene (Tark jt., 2005). *rulAB* kodeerib RulAB valku, mis on Pol V homoloog ja aitab rakkudel toime tulla DNA kahjustustega. Kui viia *rulAB* geenid *P. putida* kromosoomi, siis suureneb kasulike mutatsioonide tekkesagedus, võimaldades nii kohaneda stressiga (Tark jt., 2005). RulAB on samuti võimeline viima läbi vigaderohket DNA sünteesi üle kahjustatud lämmastikaluse adeniin, millega kaasneb A>C ja A>G asendusmutatsioonide teke (Saumaa jt., 2007).

Pol IV osaleb samuti statsionaarse faasi mutageneesis süsinikunälja tingimustes *P. putida* rakkudes, põhjustades raaminihkemutatsioonide tekkimist, kuid ei osale asendusmutatsioonide tekkel (Tegova jt., 2004). Erinevalt *E. coli*-st, ei sõltu *P. putida* Pol IV-ga seotud statsionaarse faasi mutagenees RecA valgust ja ei vaja statsionaarse faasi sigma faktorit RpoS (Tegova jt., 2004; Tarassova jt., 2009).

Ka GO reparatsioonirada osaleb statsionaarse faasi mutatsioonide ärahoidmisel nälgivates *P. putida* rakkudes. MutY valgu puudumise korral tõuseb nälgivates *P. putida* rakkudes asendusmutatsioonide tekkesagedus 100 korda, MutT valgu puudumisel 75 korda. MutM valgu puudumisel mutatsioonisagedus ei erine algtüvest (Saumaa jt., 2002; Saumaa jt., 2007). MutY hoiab ära G>T asendusmutatsioonide teket ning MutT hoiab ära nii A>C kui ka T>G asendusmutatsioonide teket. *mutM*-defektse tüve mutatsioonispekter on erinev *P. putida* algtüve mutatsioonispektrist. *mutM*-defektses tüves esineb G>T asendusmutatsioone oluliselt rohkem kui algtüves, mis viitab sellele, et MutM on nälgivates *P. putida* rakkudes

funktsionaalne (Saumaa jt., 2007).

MMR reparatsiooniraja ensüüme MutS ja MutL kodeerivate *mutS* ja *mutL* geenide defektsuse korral on nälgivates *P. putida* rakkudes asendusmutatsioonide tekkesagedus samuti tõusnud. Mutatsioonispekter erineb aga algtüvest, mis näitab, et MMR reparatsioonisüsteem on nälgivates *P. putida* rakkudes funktsionaalne (Saumaa jt., 2006).

UV-kiirguse põhjustatud DNA kahjustuste parandamises osaleb bakteris *P. putida* NER reparatsioonirada, kuhu kuuluvad geenid *uvrA*, *uvrA2*, *uvrB* ja *uvrC* (Tark jt., 2008). Kuid *uvrA2*, *uvrB* ja *uvrC* geenide defektsuse korral väheneb statsionaarse faasi mutatsioonide tekkesagedus *P. putida* rakkudes. Järelikult NER mitte ainult ei osale DNA reparatsioonil, vaid soodustab ka statsionaarse faasi mutatsioonide tekkimist (Tark jt., 2008).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Meie laboris on varem uuritud alküülkahjustuste reparatsioonisüsteemi metüültransferaaside Ada ja Ogt osalust mutatsiooniprotsessides nii kasvavates kui ka nälgivates *P. putida* rakkudes. Leiti, et kuigi Phe⁺ mutatsioonispektrite erinevuse alusel võib öelda, et need valgud on nälgimisperioodi kestel funktsionaalsed, jäi *ada* ja *ogt* geenide defektsuse korral üldine mutatsioonisagedus ning nälgivate rakkude mutatsioonisagedus algtüvega samale tasemele, samas kui kasvavate bakterirakkude Phe⁺ mutantide tekkesageduses oli siiski 3 kordne tõus (Laura Kunder, avaldamata andmed). Seega, kuna hiljuti avastati uus reparatsioonirada, kus osaleb alküülkahjustuste eemaldamises ka alküültransferaasi sarnane valk ATL (Marginson jt., 2007), otsustasime uurida seda valku kodeeriva *atl* geeni defektsuse mõju mutatsiooniprotsessidele bakteris *P. putida*.

Töö eesmärgid:

- kuidas mõjutab DNA alküülkahjustuste reparatsioonil osaleva alküültransferaasi sarnast valku (ATL) kodeeriva geeni *atl* defektsus mutatsioonide teket kasvavates ja nälgivates *P. putida* rakkudes;
- kas ja milline on *atl* defektsuse mõju nukleotiidi väljalõike reparatsioonirajale mutatsiooniprotsessides.

2.2. Materjalid ja metoodika

2.2.1. Töös kasutatud söötmed, plasmiidid ja bakteritüved

Täissöötmena kasutasime Luria-Bertani (LB) söödet (Miller, 1972) ja minimaalsöödet M9 baasil (Adams, 1959), mis sisaldas lisaks M9-le mikroelementide lahust 2,5 ml/l (Bauchop ja Elsdén, 1960) ja aminohapete hüdroolüsaati CAA (*casamino acids*) lõppkontsentratsiooniga 0,2% koos täiendava L-trüptofaaniga (20 µg/ml). Süsinikuallikana kasutasime glükoosi (Glc) lõppkontsentratsiooniga 0,2% või fenooli (Phe) lõppkontsentratsiooniga 2,5 mM. Tardsöötmete saamiseks lisasime agarit 15 g/l.

Plasmiidide ja bakteritüvede selekteerimiseks kasutasime antibiootikume: ampitsilliin (Amp; 100 µg/ml), karbenitsilliin (Cb; 1000-3000 µg/ml), kanamütsiin (Km; 50 µg/ml), tetratsükliini (Tet; 50 µg/ml), gentamütsiini (Gm; 10 µg/ml), streptomütsiini (Sm; 1000 µg/ml) ja rifampitsiini (Rif; 100 µg/ml).

P. putida rakke kasvasime temperatuuril 30 °C, *E. coli* rakke temperatuuril 37 °C. Kui kasutasime vedelsöödet, siis aereerisime kultuure loksutil. Töös kasutatavad bakteritüved ja plasmiidid on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Töös kasutatud bakteritüved ja plasmiidid

Bakteritüvi	Genotüüp või iseloomustus	Allikas
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 ΔlacU169 (f80 lacZΔM15) recA1 endA1 hsdR17 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
CC118 λ pir	<i>Δ(ara-leu) araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE (Am)</i>	Herrero jt., 1990
HB101	<i>subE44 subF58 hsdS3 (r_B⁻m_B⁻) recA13proΔ2 lacY1 galK2 rps20 xyl-5 mtl-1</i>	Boyer ja Roulland-Dussoix, 1969
<i>Pseudomonas putida</i>		
PaW85	Tn4652, identne tüvega KT2440	Bayley jt., 1977
PaWUvrA	PaW85; Δ uvrA::tet	Tark jt., 2008
PaWUvrB	PaW85; Δ uvrB::tet	Tark jt., 2008
PaWUvrB	PaW85; <i>uvrB</i> ::sm	käesolev töö
PaWUvrA2	PaW85; Δ uvrA2::km	Tark jt., 2008
PaWATL	PaW85; Δ atl::km	käesolev töö
PaWATL	PaW85; Δ atl::gm	käesolev töö
PaWATLUvrA	PaW85; Δ atl::km; Δ uvrA::tet	käesolev töö
PaWATLUvrB	PaW85; Δ atl::km; Δ uvrB::tet	käesolev töö
PaWATLUvrA2	PaW85; Δ atl::gm; Δ uvrA2::km	käesolev töö
PaWUvrAUvrB	PaW85; Δ uvrA::tet; <i>uvrB</i> ::sm	käesolev töö
PaWATLUvrAUvrB	PaW85; Δ atl::km; Δ uvrA::tet; <i>uvrB</i> ::sm	käesolev töö

Plasmiidid		
pBluescript KS(+)	kloneerimisvektor (Amp ^r)	Stratagene
pUTmini-Tn5-Km1	Tn5Km1 minitransposooni sisaldav pUT plasmiid (Amp ^r , Km ^r)	de Lorenzo jt., 1990

pBK-miniTn7-ΩGm	Tn7-ΩGm minitransposooni sisaldav pBK plasmiid (Amp ^r , Gm ^r)	Koch jt., 2001
pGP704L	homoloogiliseks rekombinatsiooniks vajalik ülekandeplasmiid (Amp ^r)	Pavel jt., 1994
pRK2013	plasmiid pGP704L konjugatsiooniks vajalik helperplasmiid (Km ^r)	Figurski ja Helinski, 1979
pKSsm	Sm ^r geen kloonitud pBluescript KS(+) vektorisse	Sidorenko jt., 2011
pKS <i>atI</i>	<i>atI</i> geen kloonitud pBluescript KS(+) vektorisse restriktasididega SacI ja Acc65I	käesolev töö
pKSΔ <i>atI</i> ::km	Km ^r geen kloonitud <i>atI</i> geeni Eco52I/HincII restriksioonisaitidesse vektoris pKS <i>atI</i>	käesolev töö
pKSΔ <i>atI</i> ::gm	Gm ^r geen kloonitud <i>atI</i> geeni Eco52I/HincII restriksioonisaitidesse vektoris pKS <i>atI</i>	käesolev töö
pKS <i>uvrB</i>	<i>uvrB</i> geeni sisaldav PCR produkt kloonitud pBluescript KS(+) vektorisse restriktasi HincII lõikesaiti	Tark jt., 2008
pKS <i>uvrB</i> ::sm	Sm ^r geeniga katkestatud <i>uvrB</i> geen kloonitud pBluescript KS(+) vektorisse	Tark-Dame, avaldamata
pGP704LΔ <i>atI</i> ::km	Δ <i>atI</i> ::km kloonitud plasmidi pGP704L restriktasididega SacI ja Acc65I	käesolev töö
pGP704LΔ <i>atI</i> ::gm	Δ <i>atI</i> ::gm kloonitud plasmidi pGP704L restriktasididega SacI ja Acc65I	käesolev töö
pGP704L <i>uvrB</i> ::sm	<i>uvrB</i> ::sm kloonitud plasmidi pGP704L	Tark-Dame, avaldamata
pGP704LΔ <i>uvrA2</i> ::km	Δ <i>uvrA2</i> ::km kloonitud plasmidi pGP704L	Tark jt., 2008
pKT <i>pheA22TAG</i>	mutantne <i>pheA</i> geen plasmidis pKT240, kus aminohapet Leu kodeeriv koodon CTG asemel asub <i>pheA</i> geeni 22 positsioonis stoppkoodon TAG	Tegova jt., 2004

2.2.2. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

PCR-i kasutasime *P. putida atl* geenijärjestuse amplifitseerimiseks, Km, Gm ja Sm resistentsusgeenide järjestuste amplifitseerimiseks ning meie loodud konstruktide ja bakteritüvede õigsuse kontrollimiseks. Matriitsina kasutasime plasmiidset või kromosomaalset DNA-d ja bakterirakke. Reaktsiooni maht oli 20 µl ja sisaldas lisaks matriitsile 1 x PCR segu (75 mM Tris HCl pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Triton X-100; 2,5 mM MgCl₂; 1 mM tartrasiin; 0,2 mM dNTP; 0,5% Ficoll 400) ja 15 pmol kumbagi praimerit ning 1 ühik Taq DNA polümeraasi, mis on puhastatud prof. J. Sedmani laboris. Maht viidi 20 µl-ni destilleeritud ja autoklaavitud veega. PCR-i teostasime firma „Eppendorf“ või „Biometra“ PCR-i masinatega. Kasutatud praimerid on välja toodud tabelis 2.

PCR reaktsioonid viidi läbi tingimustel:

- DNA denaturatsioon: 96 °C, 30-60 sekundit;
- Praimerite seondumine matriits-DNA-le: 30 sekundit temperatuuril 54-57 °C;
- DNA süntees; 72 °C, sünteesiaeg 1 minut 1000 nukleotiidi kohta.

Tsüklit korraldati 25 korda.

Tabel 2. Töös kasutatud praimerid

Nimi	Järjestus	Seondumiskoht
T3	5'-ATTAACCCTCACTAAAG-3'	pBluescript'i universaalpraimer
T7	5'-AATACGACTCACTATAG-3'	pBluescript'i universaalpraimer
pheABamei	5'-AAGGCGGCTCCCGTAA-CAC-3'	komplementaarne <i>pheA</i> geeni ette jääva alaga positsioonides -22 kuni 40 initsiaatorkoodonist ATG
pheAts	5'-GTTTCATGGGGGACTGCTTC-3'	komplementaarne <i>pheA</i> geeni alaga positsioonides 295 kuni 313 allapoole initsiaatorkoodonist ATG
KmSac	5'-CAGGAGCTCGATTTATTCA-ACAAAGCC-3'	komplementaarne Km ^r geeni ette jääva alaga positsioonides -126 kuni -105 initsiaatorkoodonist ATG ja pärast Km ^r geeni positsioonides 61 kuni 82 stopkoodonist TAA

GmY	5'-CGAATTGACATAAGCCTG-TTC-3'	komplementaarne Gm ^r geeni alaga positsioonides -240 kuni -220 initsiaatorkoodonist ATG
GmA	5'-CGGCTTGAACGAATTGT-TAG-3'	komplementaarne Gm ^r geeni alaga positsioonides 528 kuni 509 pärast initsiaatorkoodonit ATG
ppATLFWSac	5'-TCCAGTCCAGGGCGATGG-ACCC-3'	komplementaarne <i>atl</i> geeni ette jääva alaga positsioonides -339 kuni -317 initsiaatorkoodonist ATG
ppATLRevAcc	5'-GTCCTGGGTAGCCGAGG-CGA-3'	komplementaarne <i>atl</i> geeni järele jääva alaga positsioonides 442 kuni 422 translatsiooni stoppkoodonist TAG
ppATLlookus	5'-CATTGGCCAAGGTCACCT-TGC-3'	komplementaarne <i>atl</i> geeni ette jääva alaga positsioonides -456 kuni -435 initsiaatorkoodonist ATG
uvrA2ylalt1125	5'-AACTGCTCGAACGCATTG-ATA-3'	komplementaarne <i>uvrA2</i> geeni alaga positsioonides 1125 kuni 1146 initsiaatorkoodonist ATG
uvrA2alt2100	5'-CCAGGGTTTCGGGGTT-GTA-3'	komplementaarne <i>uvrA2</i> geeni alaga positsioonides 2119 kuni 2100 initsiaatorkoodonist ATG

2.2.3. Gelelektroforees

PCR-ga amplifitseeritud DNA fragmente, restriksioonifragmente ja plasmiidse DNA eraldumist analüüsisime gelelektroforeesil. Selleks lisasime restriksioonisegule või plasmiidset DNA-d sisaldavale lahusele foreesivärvi (0,04% broomfenoolsinise lahuse 50%-lises glütseroolis, 5 µl foreesivärvi 20 µl restriksioonisegu kohta või 1 µl foreesivärvi 5 µl plasmiidse DNA lahuse kohta). Seejärel kandsime proovid horisontaalsele 1% agarosgeelile 1xTAE puhvril (50 mM Tris-atsetaat, 1mM EDTA, pH 8,2). Agarosgeelile oli lisatud etiidiumbromiidi lõppkontsentratsiooniga 0,1 µg/ml. Paralleelselt proovidega lisasime ka firma „Fermentas“ DNA suurusmarkeri „Zipruler 2“. Elektroforees toimus toatemperatuuril pingel 130 V ja geeli pildistasime UV valguses.

2.2.4. DNA sadestamine

DNA sadestamiseks lisasime DNA-d sisaldavale segule 1/10 mahust 5 M NaCl lahust ja 2,5 mahtu 96° etanooli. Sadestasime saadud segu -20 °C juures 20 minutit ning seejärel tsentrifuugisime temperatuuril 4 °C 20 minutit firma „Heraeus“ tsentrifuugiga „Biofuge Fresco“ maksimumpööretel (13000 x g). Seejärel eemaldasime supernatandi, lisasime DNA sademe pesemiseks 100 µl 75° etanooli ning tsentrifuugisime 10 min temperatuuril 4 °C firma „Heraeus“ tsentrifuugiga „Biofuge Fresco“ maksimumpööretel (13000 x g). Eemaldasime etanooli ning kuivatasime DNA temperatuuril 37 °C. Sadenenud DNA lahustasime destilleeritud vees.

2.2.5. DNA ligeerimine

Uuritava DNA fragmendi ja plasmidi DNA ahelate otste ühendamiseks kasutasime ligaasireaktsiooni. Reaktsiooni lõppmaht oli 20 µl ning see sisaldas uuritavat DNA-d, restriksionaasidega avatud plasmidi, 2 µl firma „Fermentas“ 10 x ligaasipuhvrit, 2 µl 10 mM ATP-d ja 1 ühikut firma „Fermentas“ T4 faagi DNA ligaasi. Segu viidi lõppmahuni destilleeritud veega. Reaktsioon toimus üleöö temperatuuril 16 °C. Reaktsiooni peatasime, hoides segu temperatuuril 65 °C 10 minutit.

2.2.6. Plasmidse DNA eraldamine ja DNA restriksioon

Plasmidse DNA eraldamiseks kasvasime vajaliku plasmidiga *E. coli* rakke 5 ml LB söötmes üleöö. Söötmele oli lisatud plasmidi selektsiooniks vajalik antibiootikum. Bakterid tsentrifuugisime kokku firma „Eppendorf“ lauatsentrifuugiga „Mini Spin“ maksimumpööretel (13400 x g) 45 sekundi vältel. Plasmidse DNA eraldamiseks kasutasime firma Axygen Biosciences DNA eraldamise komplekti AxyPrep Plasmid Miniprep Kit ja järgisime tootja protokollile.

DNA restriksiooniks kasutasime firma „Fermentas“ restriктаase ja reaktsioonid viisime läbi vastavalt tootja protokollile. Tulemuste kontrollimiseks kasutasime geelelektroforeesi.

2.2.7. Aluselise fosfataasi töötlus ja Klenowi töötlus

Et vältida restriктаasidega avatud kloneerimisvektori kokku ligeerumist, viisime läbi aluselise fosfataasi töötlust firma „Fermentas“ fosfataasiga FastAP. Selleks lisasime vektori restriksioonisegule ühe ühiku esnüümi FastAP-d ning inkubeerisime 15 minutit temperatuuril 37 °C. FastAP inaktiveerisime, hoides proovi 5 minutit temperatuuril 75 °C.

Kui oli vaja DNA restriksioonil saadud üleulatuvaid („kleepuvaid“) otsi täis sünteesida („tõmbiks“ teha), kasutasime Klenowi töötlust. Selleks lisasime restriksioonisegule 1 ühiku firma „Fermentas“ Klenowi fragmente ja 1 µl 1 mM dNTP-d ning inkubeerisime 30 minutit temperatuuril 37 °C.

2.2.8. DNA sekveneerimine

Sekveneerimiseks vajalikud proovid valmistasime „BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“-i reaktiividega. Segu lõppmaht oli 10 µl ning see sisaldas 1 µl sekveneeritavat PCR produkti, 0,7 µl BigDye premixi, 2 µl 5 x lahjenduspuhvrit, 1,6 pmol/µl praimerit ja reaktsioonisegu viisime destilleeritud veega lõppmahuni. Sekveneerimiseks kasutasime kas pBluescript KS(+) universaalprimereid (T3 või T7, tabel 2) või Phe⁺ revertantide *pheA* geenis tekkinud mutatsioonide tuvastamiseks pheABamei praimerit (tabel 2).

Vastava reaktsiooniseguga viisime läbi 30 tsüklit reaktsiooni:

- ▲ 15 sekundit temperatuuril 95 °C;
- ▲ 10 sekundit temperatuuril 50 °C;
- ▲ 45 sekundit temperatuuril 60 °C.

Seejärel lisasime 2 µl dekstraani lahust ja 30 µl 96° etanooli ning sadestasime 15 minutit temperatuuril -20 °C. Edasi tsentrifuugisime segu firma „Heraeus“ tsentrifuugiga „Biofuge Fresco“ täispööretel (13000 x g) temperatuuril 4 °C 20 minutit ning pesime sadet kaks korda 100 µl 80° etanooliga ja kuivatasime temperatuuril 37 °C. Kui sade oli kuivanud, lahustasime selle 10 µl 100% formamiidis ning säilitasime sekveneerimiseks temperatuuril -20 °C. Kasutasime Eesti Biokeskuse tuumiklabori sekveneerimisteenust ja saadud järjestusi analüüsisime programmiga BioEdit. DNA sekveneerimistulemusi analüüsisime statistiliste analüüside teostamiseks kasutatava arvutiprogrammiga Statgraphics Centurion XV; Statpoint Inc. Tulemusi võrdlesime χ^2 testi kasutades. Statistiliselt oluline erinevus on juhul kui $P < 0,05$.

2.2.9. Kompetentsete rakkude valmistamine ja elektroporatsioon

Kompetentsete *E. coli* DH5 α ja CC118 λ pir bakterirakkude tegemiseks kasvasime baktereid üleöö 5 ml LB söötmes temperatuuril 37 °C optilise tiheduseni $A_{580}=1-1,5$. Tsentrifuugisime rakud põhja firma „Eppendorf“ lauatsentrifuugiga „Mini Spin“ täispööretel (13400 x g) ja eemaldasime söötme. Seejärel pesime rakke kaks korda 1 ml külma destilleeritud veega ja kaks korda 1 ml külma 10% glütserooliga. Rakke hoidsime pidevalt jääl. Kompetentsed rakud suspendeerisime 80 µl-s 10% glütseroolis.

Kompetentsete *P. putida* rakkude saamiseks kasvasime rakke üleöö temperatuuril 30 °C 5 ml LB-s. Tsentrifuugisime rakud kokku ja pesime kolm korda 1 ml 300 mM sahharoosi lahusega. Kompetentsed bakterirakud suspendeerisime 200 µl-s 100 mM sahharoosi lahuses.

Elektroporatsiooniks võtsime 50 µl kompetentseid rakke ja ~100 ng plasmiidse DNA lahust. Segu pipeteerisime jääl jahutatud elektroporatsiooni küveti. Elektroporatsiooniks kasutasime firma „BioRad“ elektroporaatorit „*E. coli* pulser“ pingel 2500 V. Pärast elektroporatsiooni viisime segu 1,5 ml LB söötmesse ja kasvasime 1 h vastavalt kas temperatuuril 30 °C või 37 °C. Edasi tsentrifuugisime rakud põhja, eemaldasime enamuse söötimest ning suspendeerisime rakud 100 µl samas LB söötmes ning külvasime välja selektiivtassile.

2.2.10. Kloneerimine

atl geeni kloneerimiseks kasutasime firma „Fermentas“ restriктаase ja ligaasi ning reaktsioonid viisime läbi vastavalt tootja protokollile. Vajaliku DNA fragmendi ja kloneerimisvektori sadestasime eelnevalt. Kloneerimisvektorile tegime aluselise fosfataasi töötlust, et vältida vektori kokkuligeerumist. Seejärel teostasime ligeerimisreaktsiooni. Reaktsioon toimus üleöö temperatuuril 16 °C. Järgnevalt inaktiveerisime ligaasi, hoides segu 10 minutit temperatuuril 65 °C, ning sadestasime DNA, mille lahustasime 5 µl destilleeritud vees. Ligeerimisproduktid viisime elektroporatsiooniga *E. coli* tüvesse DH5α või CC118λpir ja külvasime selektiivtassile. Kloneerumise õigsust kontrollisime PCR-ga.

2.2.11. Bakterite konjugatsioon

Bakterite konjugatsiooniks vajalikke bakteritüvesid kasvasime 1,5 ml LB söötmes üleöö. Doonortüvele *E. coli* CC118λpir, mis sisaldas homoloogiliseks rekombinatsiooniks vajalikku konjugatiivset plasmidi (pGP704L, mis sisaldas meid huvitava geeni katkestust) ja *E. coli* tüvele HB101, mis sisaldas plasmidi ülekandeks vajalikku abistajaplasmiidi pRK2013, oli söötmesse lisatud plasmidi selektsiooniks vajalikku antibiootikumi. *P. putida* retsipienttüvele antibiootikumi ei lisatud. Edasi lahjendasime rakukultuurid LB-söötmesse tiheduseni $A_{580}=0,1$ ja kasvasime eksponentsiaalsese kasvufaasi tiheduseni $A_{580}=0,6-0,8$. Antibiootikumi ei lisanud. Seejärel segasime 100 µl doonortüve, helpertüve ja retsipienttüve kokku ja külvasime 200 µl LB tardsöötmele. Seejärel kasvasime rakke temperatuuril 30 °C üleöö. Saadud rakumassi suspendeerisime 1 ml-s 1x M9 lahuses ning plaatisime 100 µl selektiivtassile, mis sisaldas süsinikuallikana glükoosi ja transkonjugantide selektsiooniks vajalikku antibiootikumi. Saadud kolooniaid külvasime paralleelselt Glc-Cb tassile ja vastavalt doonortüvele kas Glc-Km, Glc-Gm või Glc-Sm tassidele. Rakke, mis ei kasvanud Glc-Cb tassil, kuid kasvasid vastavalt doonortüvele kas Glc-Km, Glc-Gm või Glc-Sm tassil, kontrollisime PCR-ga või tegime lisaks ka *uvrB*-defektsete tüvede puhul UV-testi.

2.2.12. UV-test

P. putida uvrB defektse tüve õigsust kontrollisime lisaks PCR-le UV-testiga. Selleks külvasime LB tardsöötmele meid huvitava tüve, *P. putida* algtüve PaW85 ja juba eelnevalt olemasoleva tüve, mis sisaldas kindlasti *uvrB* geeni defektsust. Tassi esimest kolmandikku kiiritasime UV-kiirgusega 30 sekundit, teist kolmandikku 20 sekundit ja kolmandat kolmandikku 10 sekundit. Seejärel inkubeerisime tassi üleöö temperatuuril 30 °C. *P. putida* algtüvi PaW85 pidi kiirgusdoosi üle elama ja ja söötmel kasvama, kuna sisaldab funktsionaalset *uvrB* geeni. Tüvi, milles *uvrB* geen oli rikutud, kiirgusdoosi üle ei elanud ja seetõttu söötmele kolooniaid ei tekkinud. Kui meid huvitavas tüves oli õnnestunud *uvrB* geeni katkestamine, siis külvijoonel kolooniaid ei olnud.

2.2.13. *P. putida* ATL defektse tüve konstrueerimine

P. putida tüve KT2440 *atl* (PP_1356) geeni järjestuse saime veebilehelt <http://cmr.jcvi.org>. ATL defektse tüve konstrueerimiseks amplifitseerisime PCR meetodil algtüve PaW85 kromosoomist *atl* geeni praimeritega ppATLFWSac ja ppATLRevAcc (tabel 2). Saadud 1130 aluspaari suuruse DNA järjestuse kloneerisime restriктаasidega SacI ja Acc65I avatud vektorisse pBluescript KS(+) ning saime plasmidi pKS*atl*. Järgnevalt viisime elektroporatsiooniga plasmidi pKS*atl* *E. coli* tüvesse DH5α ning plaatisime selektiivtassile. Tekkinud kolooniaid kontrollisime PCR-ga pBluescript KS(+) praimeritega T3 ja T7 (tabel 2). Seejärel eraldasime DH5α-st plasmidi pKS*atl* ning eralduse õigsust kontrollisime restriksioonanalüüsiga restriктаasidega SacI ja Acc65I. *atl* geeni kloneerumise õigsust kontrollisime sekveneerimisega.

atl geenist deletsiooni tegemiseks ja kanamütsiini (Km) resistentsusgeeni sisseviimiseks amplifitseerisime Km resistentsusgeeni PCR-ga plasmidist pUTmini-Tn5-Km1 praimeriga KmSac (tabel 2). Gentamütsiini resistentsusgeeni amplifitseerisime plasmidist pBK-miniTn7-ΩGm praimeritega GmY ja GmA (tabel 2). pKS*atl* plasmidi avasime restriктаasidega Eco52I ja HincII (pärast restriksiooni Eco52I-ga tegime Klenowi töötlust). Km resistentsusgeeni PCR produkti lõikasime restriктаasiga Ecl136II. Gm resistentsusgeeni PCR produkti lahust puhastasime GeneJet PCR Purification Kit-iga järgides tootja protokollit. Seejärel ligeerisime Km ja Gm resistentsusgeenid restriктаasidega Eco52I ja HincII avatud pKS*atl* plasmidi (Eco52I ja HincII lõikavad *atl* järjestusest välja 412 aluspaari suuruse fragmendi). Saadud plasmiidid pKSΔ*atl*::km ja pKSΔ*atl*::gm viisime

elektroporatsiooniga *E. coli* tüvesse DH5α ja külvasime vastavatele selektiivtassidele. Saadud kolooniaid kontrollisime PCR-ga praimeritega T3 ja T7. Õiget konstrukti sisaldavatest rakkudest eraldasime plasmiidid pKSΔ*atl*::km ja pKSΔ*atl*::gm, milledest lõikasime restriктаasidega SacI ja Acc65I välja Km ja Gm resistentsusgeenidega katkestatud *atl* geeni. Saadud DNA fragmendid viisime samade restriктаasidega avatud vektorisse pGP704L ja saime plasmiidid pGP704LΔ*atl*::km ja pGP704LΔ*atl*::gm, mis võimaldasid viia *atl* geeni katkestused bakterite konjugatsioonil homoloogilise rekombinatsiooniga *P. putida* kromosoomi. Doonortüvena kasutasime *E. coli* tüve CC118λpir, mis sisaldas homoloogiliseks rekombinatsiooniks vajalikku konjugatiivset plasmidi pGP704LΔ*atl*::km või pGP704LΔ*atl*::gm. Helpertüvena kasutasime *E. coli* tüve HB101, mis sisaldas konjugatiivse plasmidi ülekandeks vajalikku helperplasmidi pRK2013. Retsipienttüvena kasutasime kas *P. putida* algtüve PaW85 või topeltdefektsete bakteritüvede konstrueerimise korral vastavat retsipienttüve (vt. allpool). Saadud *atl*::km või *atl*::gm katkestust sisaldavate tüvede PaWATL (või erinevate topeltdefektsete tüvede) õigsust kontrollisime praimeritega ppATLlookus ja ppATLRevAcc (tabel 2).

2.2.14. *P. putida* tüvede PaWUvrB ja PaWUvrAUvrB konstrueerimine

uvrB geeni katkestamiseks vajalik streptomütsiini resistentsusgeen saadi plasmiidist pKSSm (Sidorenko jt., 2011) HincII/Ecl136II restriksioonifragmendina. Sm resistentsusgeeni sisaldav DNA järjestus viidi plasmidi pKS*uvrB* restriктаasi Eco47III lõikesaiti (Tark-Dame, avaldamata). Saadud pKS*uvrB*::sm konstrukstist lõigati *uvrB*::sm-i sisaldav DNA järjestus välja restriктаasidega Xba ja EcoRV ning saadud DNA fragment kloneeriti plasmidi pGP704L Xba/Ecl136II restriksioonisaiti mille tulemusel saadi plasmiid pGP704L*uvrB*::sm (Tark-Dame, avaldamata). Plasmidi pGP704L*uvrB*::sm viisime elektroporatsiooniga *E. coli* tüvesse CC118λpir. *P. putida* PaWUvrB (*uvrB*::sm) ja PaWUvrAUvrB tüvede saamiseks viisime läbi bakterite konjugatsiooni, kus doonortüvena kasutasime *E. coli* tüve CC118λpir, mis sisaldas homoloogiliseks rekombinatsiooniks vajalikku konjugatiivset plasmidi pGP704L*uvrB*::sm. Helpertüvena kasutasime *E. coli* tüve HB101, mis sisaldas konjugatiivse plasmidi ülekandeks vajalikku helperplasmidi pRK2013. Retsipienttüvena kasutasime *P. putida* algtüve PaW85 või PaWUvrA tüve.

2.2.15. *P. putida* tüvede PaWATLUvrA, PaWATLUvrA2 ja PaWATLUvrB konstrueerimine

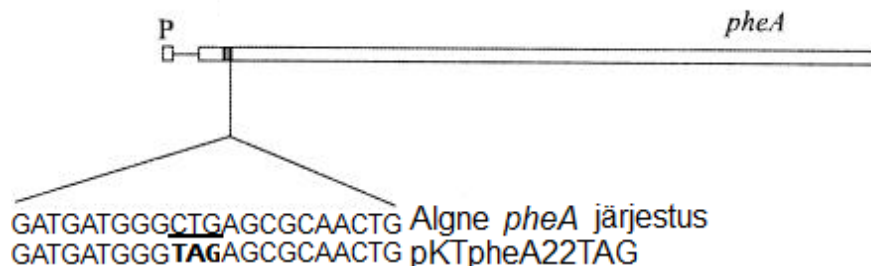
Bakterite konjugatsioonil kasutasime doonortüvena *E. coli* tüve CC118 λ pir, mis sisaldas homoloogiliseks rekombinatsiooniks vajalikku konjugatiivset plasmidi pGP704L Δ atl::km või pGP704L Δ atl::gm. Helpertüvena kasutasime *E. coli* tüve HB101, mis sisaldas konjugatiivse plasmidi ülekandeks vajalikku helperplasmidi pRK2013. Retsipienttüvedena kasutasime *P. putida* tüvesid PaWUvrB (Δ uvrB::tet), PaWUvrA2 või PaWUvrA (Tark jt., 2008). Saadud tüvede õigsust kontrollisime PCR-ga praimeritega ppATLlookus ja ppATLRevAcc (tabel 2).

2.2.16. *P. putida* PaWATLUvrAUvrB defektse tüve konstrueerimine

Bakterite konjugatsioonil kasutasime doonortüvena *E. coli* tüve CC118 λ pir, mis sisaldas homoloogiliseks rekombinatsiooniks vajalikku konjugatiivset plasmidi pGP704LuvrB::sm. Helpertüvena kasutasime *E. coli* tüve HB101, mis sisaldas konjugatiivse plasmidi ülekandeks vajalikku helperplasmidi pRK2013. Retsipienttüvena kasutasime *P. putida* tüve PaWATLUvrA (Δ atl::km; Δ uvrA::tet). Saadud transkonjugandi õigsust kontrollisime UV-testiga.

2.2.17. Phe⁺ mutantide isoleerimine

Statsionaarse faasi mutatsioonide uurimiseks kasutasime plasmiidset testsüsteemi pKTpheA22TAG (joonis 3) mis sisaldab defektset *pheA* geeni, kus 22. koodon CTG on asendatud translatsiooni stoppkoodoniga TAG. *pheA* geen kodeerib fenooli monooksügenaasi, mis võimaldab süsinikuallikana kasutada fenooli. *P. putida* algtüvi PaW85 ei ole võimeline kasvama keskkonnas, kus ainsaks süsinikuallikaks on fenool. Kui aga defektses *pheA* geenis toimub stoppkoodonis TAG asendusmutatsioon, taastub *pheA* geeni funktsioon ja rakk saab süsinikuallikana kasutada fenooli. Selline süsteem võimaldab jälgida asendusmutatsioonide teket (Tegova jt., 2004).



Joonis 3. Asendusmutatsioonide uurimiseks vajalik plasmiidne testsüsteem pKTpheA22TAG. Muudetud kujul artiklist Tegova jt., 2004.

Selleks, et uurida asendusmutatsioonide teket, viisime plasmiidse testsüsteemi pKTpheA22TAG elektroporatsiooni teel uuritavatesse bakteritüvedesse. Plasmiidi inserteerumist kontrollisime PCR-ga praimeritega pheA_{ts} ja pheA_{Bamei} (tabel 2). Seejärel kasvasime testsüsteemi sisaldavaid baktereid 6 tundi temperatuuril 30 °C glükoos M9 minimaalsöötmel, mis sisaldas testsüsteemi seleksiooniks vajalikku antibiootikumi karbenitsilliini. Edasi tegime rakukultuuridest 10⁵ lahjendused ja pipeteerisime 2,4 ml katseklaasidesse. Igast tüvest võtsime ühes katseseerias vähemalt 10 kordust. Seejärel kasvasime rakke ~18 tundi glükoos M9 minimaalsöötmel, mis sisaldas karbenitsilliini. Edasi plaatisime 250 µl rakukultuuri M9 minimaaltassile, mis sisaldas karbenitsilliini ja ainsa süsinikuallikana fenooli ning kasvasime temperatuuril 30 °C. Phe⁺ kolooniate teket jälgisime 14 päeva jooksul pärast plaatimist. Phe⁺ revertandid tekkisid alates katse teisest päevast. Alates kolmandast päevast tekkinud Phe⁺ kolooniates olid mutatsioonid tekkinud juba süsinikunäljas (Kasak jt., 1997; Tegova jt., 2004). Phe⁺ revertantide tekkesageduse arvutamiseks määrasime meid huvitavates tüvedes elusrakkude arvu (CFU- *Colony Forming Units*) kogu katse vältel. Selleks lõikasime 1 ml pipetiotsikuga tassilt agariketta, millel ei olnud Phe⁺ kolooniaid (mis on 1/100 kogu tassi pindalast) ja suspendeerisime 1 x M9-s. Seejärel tegime lahjendusterea ja pipeteerisime 10 µl igast lahjendusest LB tardsöötmel. Arvestades tassile tekkinud kolooniate arvu, lahjenduse suurust ja agariketta pindala, arvutasime tassil olevate elusrakkude arvu. Phe⁺ revertantide tekkesageduse arvutasime 10⁹ CFU/ml kohta.

2.2.18. *P. putida* rifampitsiini-resistantsete mutantide tekkesageduse määramine

Spontaansete mutatsioonide tekkesageduse kasvavates *P. putida* rakkudes arvutasime rifampitsiini (Rif) resistantsete mutantide tekkesageduse järgi. Selleks kasvasime uuritavaid bakteritüvesid loksutil 1 ml M9 glükoos-minimaalsöötmes 6 tundi temperatuuril 30 °C. Seejärel tegime 10^5 lahjenduse M9 glükoos-minimaalsöötmesse ja kasvasime rakke 2,4 ml-s 18 tundi temperatuuril 30 °C. Edasi plaatisime 100-500 µl baktereid igast kultuurist LB tardsöötmele, mis sisaldas 100 µg/ml Rif-i ning inkubeerisime temperatuuril 30 °C. Rif söötmetele ilmunud Rif^R kolooniad lugesime kokku 24 tunni ja 48 tunni möödudes. Rif^R mutantide tekkesageduse arvutamiseks määrasime kolmest sõltumatust 18 tundi kasvanud kultuurist bakterirakkude arvukuse, tehes kultuurist 10^7 - 10^9 lahjendused, mille pipeteerisime LB tassile. Arvestades lahjendusfaktorit, leidsime elusrakkude arvu 1 ml kultuuris. Rif^R mutantide tekkesageduse leidmiseks arvestasime tekkinud kolooniad ümber 1 ml kultuuri kohta ja jagasime elusrakkude arvuga. Tulemuste varieeruvust analüüsisime faktoriaalse dispersioonanalüüsiga (ANOVA, Analysis of Variance), millele järgnes Bonferroni test (Post Hoc), leidmaks statistiliselt olulisi erinevusi tüvede vahel.

2.3. Tulemused ja arutelu

Alküülivad ühendid on rakkudele ohtlikud, kuna modifitseerivad DNA-s hapniku ja lämmastiku aatomeid, põhjustades sellega DNA kahjustusi (Shrivastav jt., 2010). DNA alküülkahjustused võivad olla kas tsütotoksilised või mutageensed. Mutageneesi seisukohalt on olulisemad O⁴-metüültümiin ja O⁶-metüülguaniin, kuna tekitavad valepaardumisi ja põhjustavad sellega vastavalt AT>GC ja GC>AT transitsioone (Preston jt., 1986; Sedgwick ja Lindahl, 2002).

DNA alküülkahjustuste eemaldamiseks on neli võimalikku rada. Esiteks metüültransferaasid ja oksüdatiivsed demetülaasid, mis võivad kahjustusi parandada otseselt. Teiseks võivad kahjustatud lämmastikaluste eemaldamisel osaleda BER raja glükosülaasid. Kolmas võimalus on kahjustatud nukleotiid eemaldada MMR reparatsioonisüsteemiga (Nieminuszczy ja Grzesiuk, 2007) ja neljas võimalus alküülkahjustuste kõrvaldamiseks on hiljuti avastatud alküültransferaasi sarnane valk (ATL), mis aitab DNA alküülkahjustusi eemaldada nukleotiidi väljalõike reparatsiooniraja abil (Tubbs ja Tainer, 2010).

2.3.1. Mutatsiooniprotsesside uurimiseks vajalike *P. putida* tüvede konstrueerimine

Teadaolevalt eemaldavad bakteris *E. coli* alküülkahjustusi valgud Ada ja Ogt (Sedgwick ja Lindahl, 2002). Meie laboris on varem uuritud alküülkahjustuste reparatsioonisüsteemi metüültransferaaside Ada ja Ogt osalust mutatsiooniprotsessides nii kasvavates kui ka nälgivates *P. putida* rakkudes. Leiti, et nälgivates *P. putida* Ada- ja Ogt-defektsetes tüvedes jäi mutatsioonisagedus samale tasemele algse tüvega PaW85, kuid kasvavates rakkudes tekkis Phe⁺ mutante võrreldes algse tüvega PaW85 3 korda rohkem (Laura Kunder, avaldamata andmed). Seega, kuna hiljuti avastati uus reparatsioonirada, kus osaleb alküülkahjustuste eemaldamises ka alküültransferaasi sarnane valk ATL (Marginson jt., 2007), otsustasime uurida seda valku kodeeriva *atl* geeni defektsuse mõju mutatsiooniprotsessidele bakteris *P. putida*. Vastavalt veebilehele <http://www.cmr.jcvi.org> on *P. putida* tüves KT2240 üks *atl* geen ja selle geeni nukleotiidses järjestuses põhjal tuletatud aminohappeline järjestus on 28,3% ulatuses identne ja 43,4% ulatuses sarnane *E. coli* tüve K12-MG1655 ATL valgu aminohappelise järjestusega ning 58% ulatuses identne ja 64% ulatuses sarnane *P. aeruginosa* tüve PAO1 ATL valgu aminohappelise järjestusega. Kuna nii *T. thermophiluse* kui ka *E. coli* puhul on näidatud, et ATL interakteerub NER reparatsiooniraja valguga UvrA (Morita jt., 2008; Reißner jt., 2009), siis selleks, et uurida ATL valgu ja NER

reparatsiooniraja osalust mutatsiooniprotsessides kasvavates ja nälgivates *P. putida* rakkudes ning nende omavahelist seost, konstrueerisime vastavate geenide suhtes defektsed *P. putida* tüved PaWATL, PaWATLUvrA, PaWATLUvrA2, PaWATLUvrB, PaWUvrAUvrB ja PaWATLUvrAUvrB. Nende tüvede konstrueerimine on täpsemalt kirjeldatud bakalaureusetöö Materjal ja metoodika osas. Tüved PaWUvrA, PaWUvrA2 ja PaWUvrB on konstrueeritud meie laboris varem (Tark jt., 2008).

2.3.2. DNA alküülkahjustuste reparatsioonis osaleva *atl* geeni ja NER raja geenide topeltdefektsuse koosmõju mutatsioonisagedusele kasvavates *P. putida* rakkudes

Kuna kirjanduses teadaolevalt peaks ATL osalema nukleotiidi väljalõike reparatsioonisüsteemis NER, siis järgnevalt uurisime ATL ja NER raja omavahelist mõju üldisele mutatsioonisagedusele kasvavates rakkudes, kasutades selleks rifampitsiini resistentsuse tekkel põhinevat testsüsteemi. Rifampitsiin seondub RNA polümeraasi β -subühikuga DNA/RNA kanalis ja peatab transkriptsiooni elongatsiooni. RNA polümeraasi β -subühikut kodeerib *rpoB* geen (Campbell jt., 2001). Rifampitsiini sisaldaval tardsöötmel suudavad kasvada vaid need bakterirakud, kellel on plaatimise eelselt kasvavas kultuuris tekkinud mutatsioonid *rpoB* geenis (Garibyan jt., 2003, Jatsenko jt., 2010). Spontaansete mutatsioonide tekkesageduse määramiseks plaatisime nii algtüve PaW85, *atl*-defektse tüve PaWATL, kui ka *atl* ja NER geenide topeltdefektsete tüvede rakke rifampitsiini sisaldavale LB täissöötmel ja jälgisime kolooniate moodustumist 48 tunni jooksul.

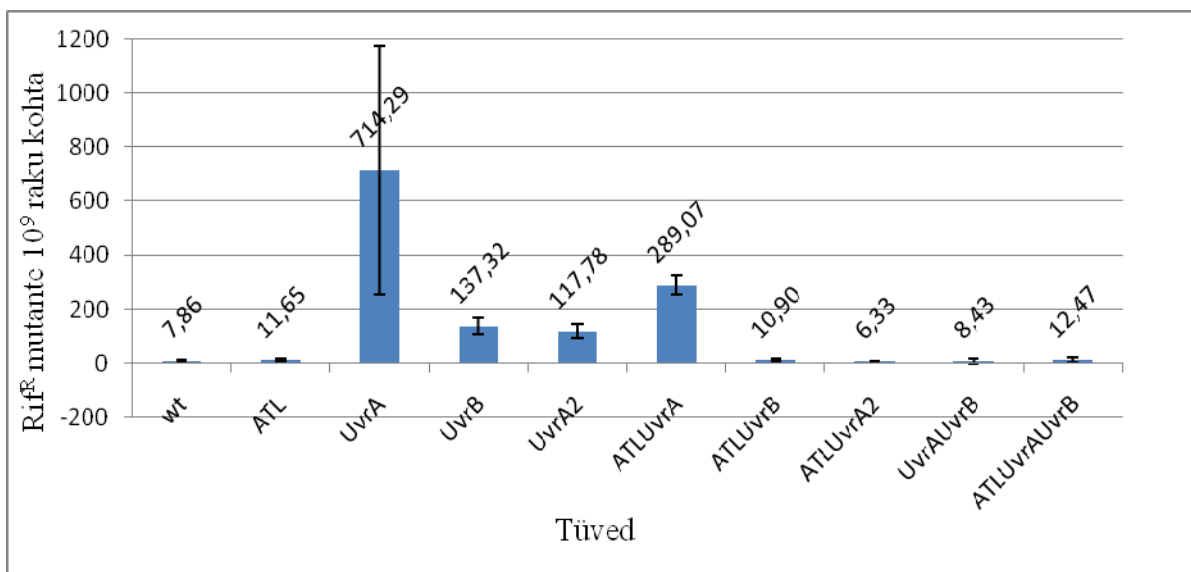
Kasvavate rakkude mutatsioonisagedust määrasime ka plasmiidis pKTp_{heA}22TAG asuvat testsüsteemi kasutades. Plasmiidne testsüsteem (joonis 3) sisaldab defektset *pheA* geeni, kus 22. koodon CTG on asendatud translatsiooni stoppkoodoniga TAG (Tegova jt., 2004). *pheA* geen kodeerib fenooli monooksügenaasi, mis võimaldab süsinikuallikana kasutada fenooli. *P. putida* algtüvi PaW85, milles plasmiidiga sisseviidud *pheA* geen on defektne, ei ole võimeline kasvama keskkonnas, kus ainsaks süsinikuallikaks on fenool. Kui aga defektses *pheA* geenis toimub stoppkoodonis TAG asendusmutatsioon, võib taastuda funktsionaalne *pheA* geen, mille produkt on fenooli monooksügenaas ja rakk saab süsinikuallikana kasutada fenooli. Selline testsüsteem võimaldab jälgida asendusmutatsioonide teket (Tegova jt., 2004). Käesolevas töös plaatisime plasmiidset testsüsteemi sisaldavad eelpoolmainitud *P. putida* ATL ja NER defektsed tüved fenooli sisaldavatele minimaaltassile ja jälgisime Phe⁺ revertantide teket. Kasvavate rakkude

mutatsioonisageduse määrasime teisel päeval selektiivsöötmetele tekkinud Phe⁺ mutantide arvukuse alusel.

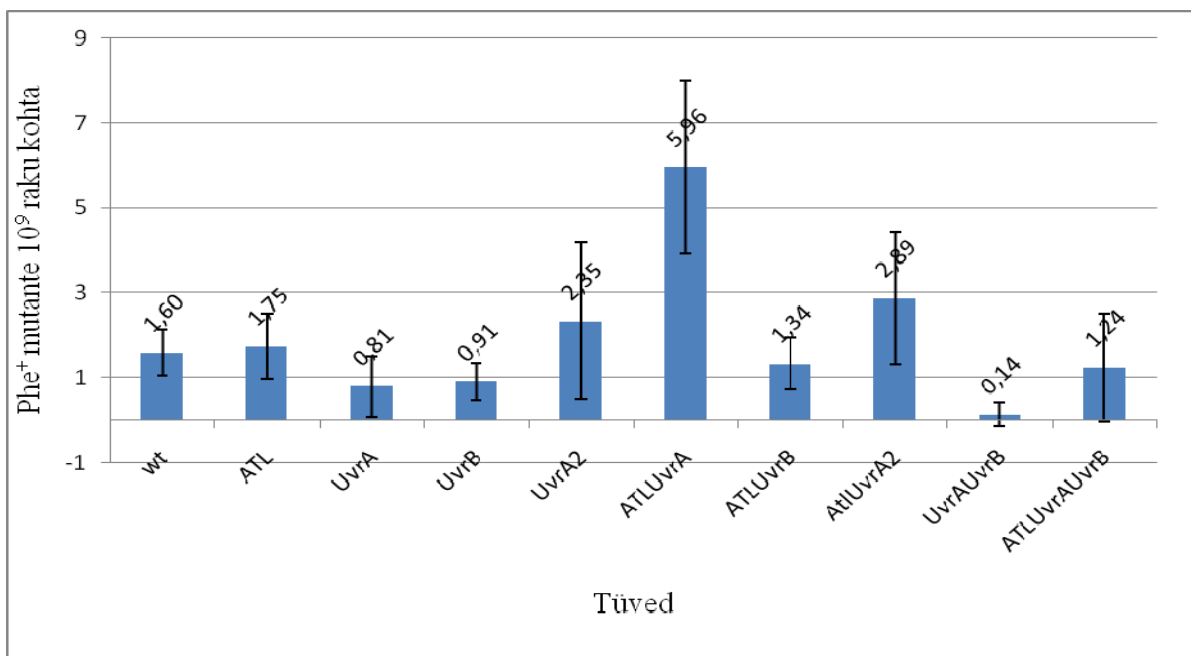
Selgus, et *P. putida uvrA*-defektne PaWUvrA tüvi andis rifampitsiini testsüsteemi kasutades mutaatorfenotüübi (joonis 4A). Kuna UvrA-defektse tüve PaWUvrA puhul oli katsekõikuvus väga suur, siis ATL osaluse statistilise olulisuse uurimiseks eemaldasime analüüsist nii PaWUvrA kui ka PaWATLUvrA. Statistiliselt oluliste erinevuste leidmiseks mutatsioonisageduste vahel kasutasime faktoriaalse ANOVA statistilise analüüsi meetodit ja „Tukey HSD” testi. Erinevus oli statistiliselt oluline, kui $P < 0,05$.

Kasutades Rif^R testsüsteemi nägime, et spontaansete mutatsioonide tekkesagedus jäi ATL-defektses tüves võrreldes algse tüvega samale tasemele (joonis 4A). Rif^R testsüsteemiga mõõdetuna oli statistiliselt oluliselt suurenenud aga Rif^R mutantide teke võrreldes algse tüvega PaW85 tüvedes PaWUvrB ($P=0,000032$) ja PaWUvrA2 ($P=0,000032$). Lisaks leidsime, et oluline erinevus on ka tüvede PaWUvrB ja PaWATLUvrB mutatsioonisageduste võrdluses. ATLUvrB-topeltdefektses tüves oli võrreldes UvrB-defektse tüvega Rif^R mutantide tekkesagedus ligikaudu 10 korda madalam ja ATLUvrA2 suhtes topeltdefektses tüves võrreldes UvrA2-defektse tüvega ligikaudu 18 korda madalam ($P=0,000032$). Saadud tulemustest võiks järeldada, et kasvavates *P. putida* rakkudes hoiavad valgud UvrB ja UvrA2 ära spontaansete mutatsioonide tekkimist. Samas, kuna nii UvrB- kui ka UvrA2-defektses tüves on ATL funktsionaalne, ent mutatsioonisagedus on kõrgem kui ATLUvrB- ja ATLUvrA2-defektses tüves, siis võib see viidata sellele, et ATL presenteerib küll kahjustust UvrA-le, aga NER rada edasi korrektselt ei toimi. Rif^R mutantide tekkesagedus oli PaWUrvAUvrB ning PaWATLUvrAUvrB tüvedes võrreldes algse tüvega samal tasemel, seega nende NER raja valkude puudumist kompenseerivad edukalt teised reparatsioonimehhanismid. Aga kuna valimi maht on väike, oleks kindlasti vaja ka lisakatseid teha, et eelnevat kindlalt väita. Statistilise analüüsi tulemusel selgus, et Phe⁺ revertantide tekkel ei olnud ühegi uuritud üksikmutandi puhul statistiliselt olulist erinevust võrreldes algse tüvega PaW85. Samuti ei olnud *atl* ja NER raja geenide topeltdefektsetes tüvedes tekkinud Phe⁺ mutantide sageduses statistiliselt olulist erinevust võrreldes tüvega PaWATL (joonis 4B). Kahe testsüsteemi vaheline tulemuste erinevus võib tuleneda mutatsioonide märklaua asukohast genoomis. Rif^R testsüsteemi puhul asub märklaud kromosoomis ja Phe⁺ testsüsteemi puhul plasmiidis.

(A)



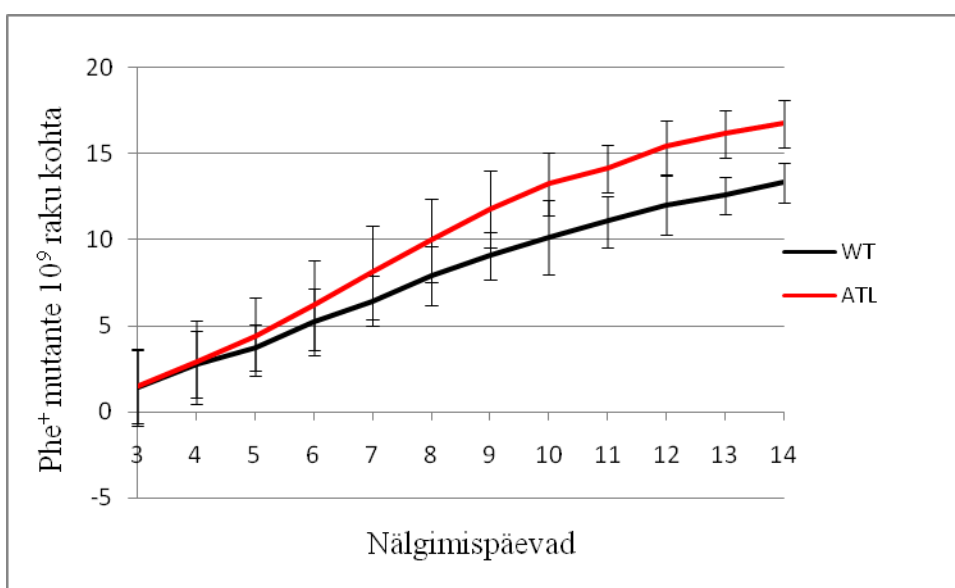
(B)



Joonis 4. (A) Rif^R mutantide teke 1 x 10⁹ elusraku kohta *P. putida* algse tüves PaW85 (wt) ning *atl* ja NER raja geenide defektsetes tüvedes. Joonisel on esitatud 20 sõltumatu paralleelkatse keskmised tulemused ja keskväärtuste 95% usalduspiirid. (B) Teisel katsepäeval asendusmutatsioonide tulemusena tekkinud Phe⁺ revertantide arvukus *P. putida* alg tüves PaW85 (wt) ning *atl* ja NER raja geenide defektsetes tüvedes. Joonisel on esitatud sõltuvalt tüvest 20-70 sõltumatu paralleelkatse tulemused ja keskväärtuste 95% usalduspiirid.

2.3.3. DNA alküülkahjustuste reparatsioonis osaleva *atl* geeni defektsuse mõju mutatsioonisagedusele nälgivates *P. putida* rakkudes

Selleks, et uurida *atl* geeni defektsuse mõju mutatsioonisagedusele nälgivates *P. putida* rakkudes, plaatisime pKTp_{heA22}TAG testsüsteemi sisaldavaid *P. putida* algtüve PaW85 rakke ja *atl* geeni suhtes defektse tüve PaWATL rakke fenooli minimaaltassile. Plasmiidsete testsüsteemide kasutamisel ilmuvad Phe⁺ kolooniad selektiivplaatidele alates katse teisest päevast. Alates kolmandast päevast ilmunud Phe⁺ kolooniates on mutatsioonid tekkinud aga juba süsinikunäljas olevates rakkudes selektiivplaatidel (Kasak jt., 1997; Tegova jt., 2004). Phe⁺ revertantide teket jälgisime 14 päeva jooksul. Tulemused on toodud joonisel 5.



Joonis 5. Asendusmutatsioonide tulemusel tekkinud Phe⁺ revertantide akumulatsioon *P. putida* algse tüves PaW85 (WT) ja *atl* geeni defektses tüves PaWATL (ATL). Phe⁺ mutantide teke on arvatud 1 x 10⁹ elusraku kohta. Joonisel on esitatud 70 sõltumatu paralleelkatse tulemused ja standardviga.

Joonisel 5 on näha, et PaWATL Phe⁺ revertante tekkis kuni katse kümnenda päevani sarnaselt algse tüvega PaW85. Katse viimastel päevadel võib täheldada mutatsioonisageduse väikest suurenemist võrreldes algse tüvega. Eelnevalt on teada, et ATL eksponeerib alküülkahjustust NER reparatsioonisüsteemi ensüümidele, mis kahjustuse eemaldavad (Onodera jt., 2010). Meie tulemuste põhjal võib aga järeldada, et NER töötab piisavalt efektiivselt ka ilma ATL valguta ja alles pikaajalisel nälgimisperioodil võib osaleda ATL statsionaarse faasi mutatsioonide tekkimise ärahoidmisel. Samas on ka võimalik, et tüves

PaWATL kompenseerivad teised DNA reparatsioonisüsteemid ATL-i puudumise ja seetõttu on mutatsioonisagedus sarnane algtüvega PaW85. Mutatsioonisageduse väike tõus vaadeldud nälgimisperioodi viimastel päevadel võib tuleneda asjaolust, et pika nälgimisperioodi kestel tekib endogeenselt selliseid alküülivaid ühendeid, mis põhjustavad suuremaid DNA kahjustusi. Suuremaid DNA alküülkahjustusi parandab aga NER rada ja ilmselt on vajalik selleks ka ATL valk.

Kuna Phe⁺ mutatsioonisagedus nälgivates *P. putida* rakkudes oli DNA alküülkahjustuste reparatsiooni suhtes defektses tüves PaWATL sarnane algtüvega, ent arvatavat ATL valgu funktsiooni teades võiks eeldada tema puudumise mõju mutatsioonispektrile, otsustasime analüüsida ka Phe⁺ mutantide DNA järjestust. Selleks, et analüüsida tekkinud PaWATL Phe⁺ kolooniate mutatsioonispektrit, sekveneerisime kogu nälgimisperioodi jooksul tekkinud Phe⁺ revertantide DNA järjestusi. Tulemused on toodud tabelis 3.

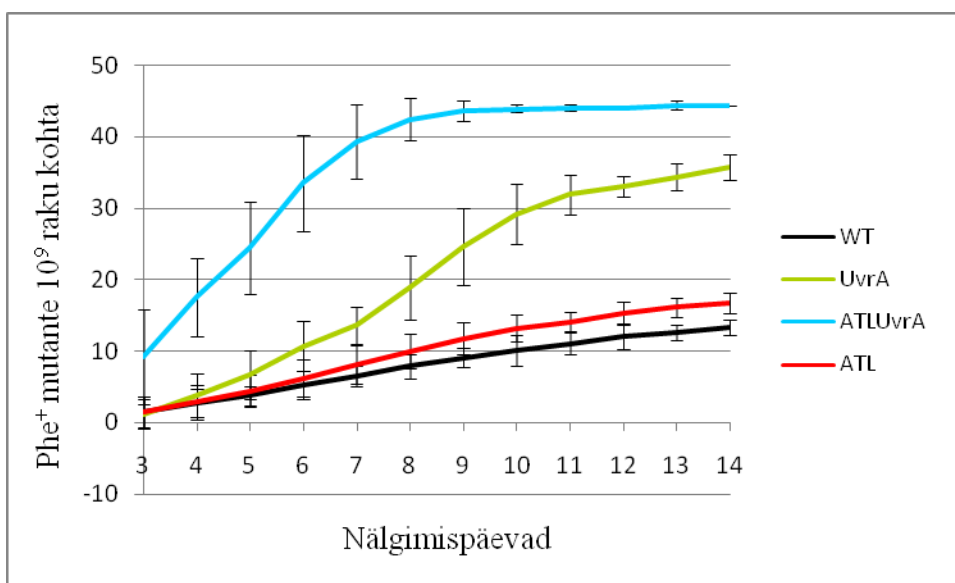
Mutatsioonispektri analüüs näitab, et sarnaselt algse tüvega PaW85 on ka tüves PaWATL peamiseks Phe⁺ fenotüüpi taastavaks asendusmutatsiooniks T>C [algse tüves PaW85 77% ja PaWATL tüves 73,9% ($P=0,4754$)]. Samas statistiliselt oluliselt rohkem esineb PaWATL tüve mutatsioonispektris G>C asendusmutatsioone [tüves PaW85 seda mutatsiooni ei esinenud ja tüves PaWATL oli 2,7% ($P=0,0159$)] ja A>C asendusmutatsioone [tüves PaW85 0 ja tüves PaWATL 1,8% ($P=0,0494$)], mis näitab, et ATL on nälgimisperioodi kestel funktsionaalne ja osaleb nende mutatsioonide ärahoidmisel nälgivates *P. putida* rakkudes.

Tabel 3. *P. putida* algse tüve PaW85 ja *atl* geeni defektse tüve PaWATL Phe⁺ revertantide TAG stoppkoodoni muutused kogu nälgimisperioodi vältel. *Saumaa jt., 2007. Statistiliselt oluline erinevus algsest tüvest ($P<0,05$) on märgitud tumedalt märkega ^W.

Sihtmärk	DNA muutus	PaW85*	PaWATL
TAG	T > C	164 (77%)	82 (73,9%)
	T > G	19 (9%)	7 (6,3%)
	T > A	1 (0,5%)	0
	G > T	12 (5,6%)	2 (1,8%)
	G > C	0	3 (2,7%)^W
	A > C	0	2 (1,8%)^W
	A > G	13 (6%)	9 (8,1%)
	A > T	4 (1,9%)	6 (5,4%)
Kokku		213	111

2.3.4. DNA alküülkahjustuste reparatsioonis osaleva *atl* geeni ja NER raja geeni *uvrA* topeltdefektsuse koosmõju mutatsioonisagedusele nälgivates *P. putida* rakkudes

Selleks, et uurida *uvrA* geeni defektsuse mõju ja *atl uvrA* geenide topeltdefektsuse koosmõju mutatsioonisagedusele nälgivates *P. putida* rakkudes, plaatisime pKTpheA22TAG testsüsteemi sisaldavaid *P. putida* algtüve PaW85 rakke, *uvrA* geeni defektse tüve PaWUvrA rakke ja *atl uvrA* geenide topeltdefektse tüve PaWATLUvrA rakke fenooli minimaaltassile. Phe⁺ revertantide teket jälgisime 14 päeva jooksul. Süsinikunälja tingimustes tekkinud Phe⁺ revertandid tekkisid alates katse kolmandast päevast. Tulemused on toodud joonisel 6.



Joonis 6. Asendusmutatsioonide tulemusena tekkinud Phe⁺ revertantide akumulatsioon *P. putida* algtüves PaW85 (WT), tüves PaWATL (ATL), tüves PaWUvrA (UvrA) ja tüves PaWATLUvrA (ATLUvrA). Phe⁺ revertantide teke on esitatud 1 x 10⁹ elusraku kohta. Joonisel on esitatud sõltuvalt tüvest 20-70 sõltumatu paralleelkatse tulemused ja standardviga.

Jooniselt 6 on näha, et *uvrA* geeni defektsuse korral on mutatsioonisagedus nälgivates *P. putida* rakkudes oluliselt kõrgem algtüvest (ca 3 korda), millest võib järeldada, et UvrA valk osaleb mutatsioonide tekkimise ärahoidmisel nälgivates *P. putida* rakkudes. Samas, *P. putida* tüves, kus on lisaks *atl* geenile ka *uvrA* geen deleteeritud (PaWATLUvrA), on mutatsioonisagedus tõusnud võrreldes *uvrA*-defektse tüvega, mis viitab sellele, et ATL osaleb statsionaarses faasis *P. putida uvrA*-defektses tüves mutatsioonide ärahoidmisel. Üldiselt arvatakse, et NERi mõju statsionaarse faasi mutatsioonidele on kas väga väike või olematu (Bridges, 1998; Foster, 1999). Varem on vaid ühes töös näidatud NERi mõju statsionaarse

faasi mutatsioonidele. 1995 aastal näitas Hall, et bakteris *E. coli* on mutatsioonisagedus trüptofaani nälja korral 10^2 - 10^3 korda kõrgem (Hall, 1995). Selleks, et analüüsida PaWUvrA ja PaWATLUvrA Phe⁺ kolooniate mutatsioonispektrit, sekveneerisime kogu nälgimisperioodi jooksul tekkinud Phe⁺ revertantide DNA järjestust *pheA* geenis. Tulemused on toodud tabelis 4.

Mutatsioonispektri analüüs näitab, et tüves PaWUvrA on oluliselt vähenenud T>C asendusmutatsioonide teke võrreldes algtüvega PaW85 [tüves PaW85 77% ja tüves PaWUvrA 31% ($P < 10^{-4}$)], mis viitab, et UvrA valk osaleb nende mutatsioonide tekitamises nälgivates *P. putida* rakkudes. Tüves PaWATLUvrA me seda erinevust ei näe võrrelduna tüvega PaW85 [tüves PaW85 on T>C asendusmutatsioone 77% ja tüves PaWATLUvrA 70% ($P = 0,2996$)] ega ka võrdluses tüvega PaWATL [tüves PaWATL T>C asendusmutatsioone 73,9% ja tüves PaWATLUvrA 70% ($P = 0,6569$)]. Järelikult on tüves PaWUvrA T>C asendusmutatsioonide tekke langus põhjustatud ATL-i olemasolust.

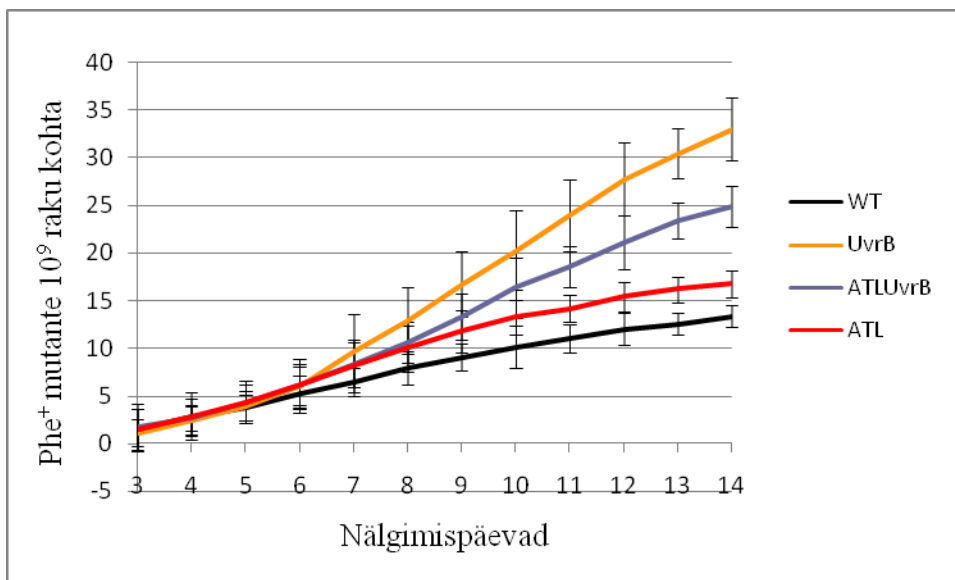
Mutatsioonispektri analüüsilt näeme veel, et võrreldes algse tüvega PaW85 on tüves PaWUvrA statistiliselt oluliselt suurenenud A>G asendusmutatsioonide [tüves PaW85 6% ja tüves PaWUvrA 32,8% ($P < 10^{-4}$)] ja A>T asendusmutatsioonide [tüves PaW85 1,9% ja tüves PaWUvrA 22,4% ($P < 10^{-4}$)] teke, mis näitab, et UvrA valk on oluline nende mutatsioonide tekke ärahoidmises nälgivates *P. putida* rakkudes. Tüves PaWATLUvrA on suurenenud A>G asendusmutatsioonide teke võrreldes algse tüvega PaW85 [tüves PaW85 6% ja tüves PaWATLUvrA 28% ($P < 10^{-4}$)] ja samuti võrrelduna tüvega PaWATL [tüves PaWATL 8,1% ja tüves PaWATLUvrA 28% ($P = 0,008$)]. Sellest võib järeldada, et tüves PaWATLUvrA ei oma ATL-defektsus A>G asendusmutatsioonide tekkesageduse tõusus mingit osa.

Tabel 4. *P. putida* algse tüve PaW85 ja tüvede PaWUvrA ning PaWATLUvrA Phe⁺ revertantide TAG stoppkoodoni muutused kogu nälgimisperioodi vältel. *Saumaa jt., 2007. Statistiliselt oluline erinevus algsest tüvest PaW85 ($P < 0,05$) on välja toodud tumedalt märgiga ^W ja statistiliselt oluline erinevus tüvest PaWATL ($P < 0,05$) on välja toodud tumedalt märgiga ^A.

Sihtmärk	DNA muutus	PaW85*	PaWATL	PaWUvrA	PaWATLUvrA
TAG	T > C	164 (77%)	82 (73,9%)	18 (31%)^W	35 (70%)
	T > G	19 (9%)	7 (6,3%)	4 (6,9%)	1 (2%)
	T > A	1 (0,5%)	0	0	0
	G > T	12 (5,6%)	2 (1,8%)	3 (5,2%)	0
	G > C	0	3 (2,7%)^W	0	0
	A > C	0	2 (1,8%)^W	1 (1,7%)	0
	A > G	13 (6%)	9 (8,1%)	19 (32,8%)^W	14 (28%)^{W; A}
	A > T	4 (1,9%)	6 (5,4%)	13 (22,4%)^W	0
Kokku		213	111	58	50

2.3.5. DNA alküülkahjustuste reparatsioonis osaleva *atl* geeni ja NER raja geeni *uvrB* topeltdefektsuse koosmõju mutatsioonisagedusele nälgivates *P. putida* rakkudes

Selleks, et uurida *uvrB* geeni defektsuse mõju ja *atl uvrB* geenide topeltdefektsuse koosmõju mutatsioonisagedusele nälgivates *P. putida* rakkudes, plaatisime pKTpheA22TAG testsüsteemi sisaldavaid *P. putida* algse tüve PaW85 rakke, *uvrB* geeni defektse tüve PaWUvrB rakke ja *atl uvrB* geenide topeltdefektse tüve PaWATLUvrB rakke fenooli minimaaltassile. Phe⁺ revertantide teket jälgisime 14 päeva jooksul. Süsinikunälja tingimustes tekkinud Phe⁺ revertantide kolooniad ilmusid selektiivplaatidele alates katse kolmandast päevast. Tulemused on toodud joonisel 7.



Joonis 7. Asendusmutatsioonide tulemusena tekkinud Phe⁺ revertantide akumulatsioon *P. putida* algse tüves PaW85 (WT), tüves PaWATL (ATL), tüves PaWUvrB (UvrB) ja tüves PaWATLUvrB (ATLUvrB). Phe⁺ mutantide teke on arvutatud 1 x 10⁹ elusraku kohta. Joonisel on esitatud sõltuvalt tüvest 20-70 sõltumatu paralleelkatse tulemused ja standarddviiga.

Jooniselt 7 on näha, et *uvrB*-defektses tüves PaWUvrB on mutatsioonisagedus oluliselt kõrgem võrreldes algse tüvega PaW85, millest võib järeldada, et UvrB valk osaleb nälgivates *P. putida* rakkudes mutatsioonide tekkimise ärahoidmises. Tüves PaWATLUvrB on aga mutatsioonisagedus võrreldes tüvega PaWUvrB nälgimisperioodi viimastel päevadel langenud. Järelikult pika nälgimisperioodi vältel soodustab ATL-i olemasolu *uvrB*-defektses *P. putida* tüves mutatsioonide teket.

Selleks, et analüüsida tekkinud PaWUvrB ja PaWATLUvrB Phe⁺ kolooniate mutatsioonispektrit, sekveneerisime kogu nälgimisperioodi jooksul tekkinud Phe⁺ revertantide *pheA* geeni järjestusi. Tulemused on toodud tabelis 5.

Mutatsioonispektri analüüs näitab, et tüves PaWUvrB on statistiliselt oluliselt suurenenud A>C asendusmutatsioonide osakaal võrreldes algse tüvega PaW85 [tüves PaW85 0 ja tüves PaWUvrB 2% ($P=0,0386$)]. Järelikult osaleb UvrB valk selle mutatsiooni tekkimise ärahoidmises nälgivates *P. putida* rakkudes. Samuti on A>C asendusmutatsiooni tekkesagedus tõusnud oluliselt tüves PaWATLUvrB võrreldes algse tüvega PaW85 [tüves PaW85 0 ja tüves PaWATLUvrB 3,8% ($P=0,0386$)], kuid võrrelduna tüvega PaWATL statistilist erinevust ei esine, millest võib järeldada, et PaWATLUvrB tüves on A>C asendusmutatsioonide tekkesageduse tõus tingitud *uvrB* geeni defektsuse mõjust. See kinnitab, et UvrB valk osaleb nälgivates *P. putida* rakkudes selle mutatsiooni tekkimise ärahoidmises.

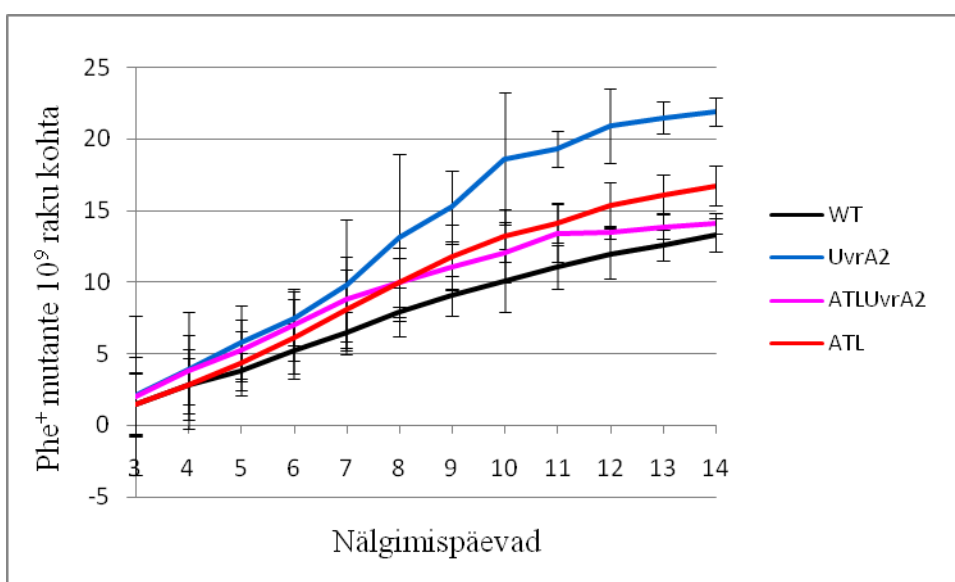
Tüves PaWATLUvrB esineb T>C asendusmutatsioone oluliselt vähem nii võrrelduna algse tüvega PaW85 [tüves PaW85 77% ja tüves PaWATLUvrB 52,8% ($P<10^{-4}$)] kui ka võrrelduna tüvega PaWATL [tüves PaWATL 73,9% ja tüves PaWATLUvrB 52,8% ($P=0,0018$)]. Kuna tüvedes PaWATL ja PaWUvrB ei ole T>C asendusmutatsiooni tekkesagedus oluliselt erinev algsest tüvest PaW85, kuid tüvi PaWATLUvrB on selle mutatsiooni tekkesageduse suhtes oluliselt erinev nii algsest tüvest PaW85 kui ka tüvest PaWATL, siis sellest võib järeldada, et T>C asendusmutatsiooni tekkesageduse langus tüves PaWATLUvrB on tingitud *atl* ja *uvrB* geenide defektsuse koostoimest. Lisaks on tüves PaWATLUvrB oluliselt tõusnud A>T asendusmutatsiooni tekkesagedus nii võrrelduna algtüvega PaW85 [tüves PaW85 1,9% ja tüves PaWATLUvrB 14,2% ($P<10^{-4}$)] kui ka võrrelduna tüvega PaWATL [tüves PaWATL 5,4% ja tüves PaWATLUvrB 14,2% ($P=0,0294$)]. Kuna tüvedes PaWATL ja PaWUvrB ei ole A>T asendusmutatsioonide tekkesagedus oluliselt erinev algsest tüvest PaW85, kuid tüvi PaWATLUvrB on selle mutatsiooni tekkesageduse suhtes oluliselt erinev nii algsest tüvest PaW85 kui ka tüvest PaWATL, siis sellest võib järeldada, et A>T asendusmutatsioonide tekkesageduse oluline tõus tüves PaWATLUvrB on tingitud *atl* ja *uvrB* geenide defektsuse koostoimest. Järelikult hoiavad valgud ATL ja UvrB nälgivates *P. putida* rakkudes koos ära A>T asendusmutatsioonide teket.

Tabel 5. *P. putida* algse tüve PaW85 ja tüvede PaWUvrB ning PaWATLUvrB puhul tekkinud Phe⁺ revertantide TAG stoppkoodoni muutused kogu nälgimisperioodi vältel. *Saumaa jt., 2007. Statistiliselt oluline erinevus algsest tüvest PaW85 ($P<0,05$) on välja toodud tumedalt märkega ^W ja statistiliselt oluline erinevus tüvest PaWATL ($P<0,05$) on välja toodud tumedalt märkega ^A.

Sihtmärk	DNA muutus	PaW85*	PaWATL	PaWUvrB	PaWATLUvrB
TAG	T > C	164 (77%)	82 (73,9%)	42 (84%)	56 (52,8%)^{W; A}
	T > G	19 (9%)	7 (6,3%)	4 (8%)	10 (9,4%)
	T > A	1 (0,5%)	0	0	0
	G > T	12 (5,6%)	2 (1,8%)	3 (6%)	7 (6,6%)
	G > C	0	3 (2,7%)^W	0	0
	A > C	0	2 (1,8%)^W	1 (2%)^W	4 (3,8%)^W
	A > G	13 (6%)	9 (8,1%)	0	14 (13,2%)
	A > T	4 (1,9%)	6 (5,4%)	0	15 (14,2%)^{W; A}
Kokku		213	111	50	106

2.3.6. DNA alküülkahjustuste reparatsioonis osaleva *atl* geeni ja NER süsteemi kuuluva geeni *uvrA2* topeltdefektsuse koosmõju mutatsioonisagedusele nälgivates *P. putida* rakkudes

Selleks, et uurida *uvrA2* geeni defektsuse mõju ja *atl uvrA2* geenide topeltdefektsuse koosmõju mutatsioonisagedusele nälgivates *P. putida* rakkudes, plaatisime pKTpheA22TAG testsüsteemi sisaldavaid *P. putida* algtüve PaW85 rakke, *uvrA2* geeni defektse tüve PaWUvrA2 rakke ja *atl uvrA2* geenide topeltdefektse tüve PaWATLUvrA2 rakke fenooli minimaaltassile. Phe⁺ revertantide teket jälgisime 14 päeva jooksul. Süsinikunälja tingimustes tekkinud Phe⁺ revertantide kolooniad ilmusid selektiivsöötmel alates katse kolmandast päevast. Tulemused on toodud joonisel 8.



Joonis 8. Asendusmutatsioonide tulemusena tekkinud Phe⁺ revertantide akumulatsioon *P. putida* algse tüves PaW85 (WT), tüves PaWATL (ATL), tüves PaWUvrA2 (UvrA2) ja tüves PaWATLUvrA2 (ATLUvrA2). Phe⁺ mutantide teke on arvatud 1 x 10⁹ elusraku kohta. Joonisel on esitatud sõltuvalt tüvest 20-70 sõltumatu paralleelkatse tulemused ja standardviga.

Jooniselt 8 on näha, et *uvrA2* geeni defektsuse korral on mutatsioonisagedus suurenenud võrreldes algse tüvega, millest võib järeldada, et UvrA2 valk on oluline statsionaarse faasi mutatsioonide ärahoidmisel *P. putida* rakkudes. Tüves PaWATLUvrA2 on mutatsioonisagedus samal tasemel algse tüvega. Järelikult soodustab ATL valgu olemasolu nälgivates *P. putida uvrA2*-defektsetes rakkudes statsionaarse faasi mutatsioonide teket.

Selleks, et analüüsida tekkinud PaWUvrA2 ja PaWATLUvrA2 Phe⁺ kolooniate

mutatsioonispektrit, sekveneerisime kogu nälgimisperioodi jooksul tekkinud Phe⁺ revertantide DNA järjestusi. Tulemused on toodud tabelis 6.

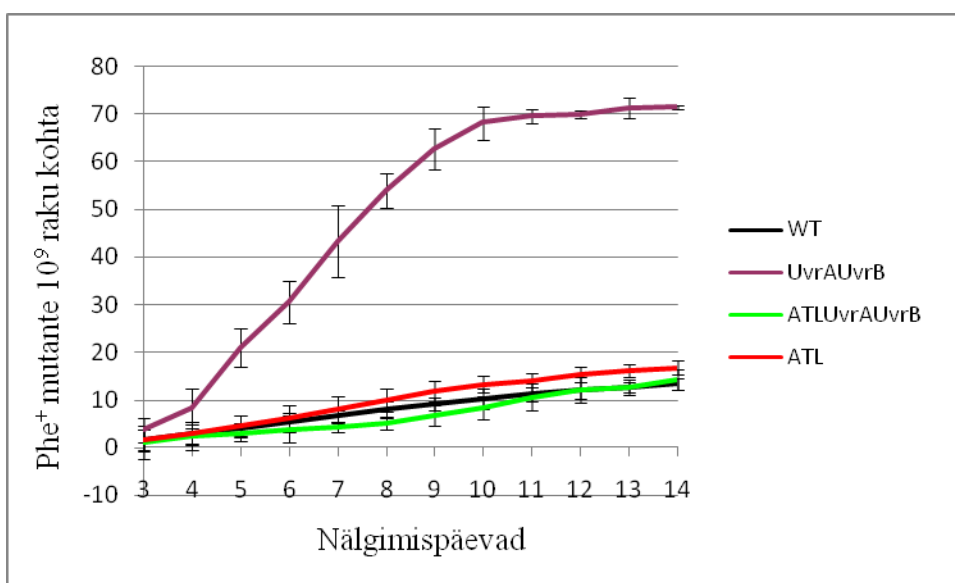
Mutatsioonispektri analüüs näitab, et tüves PaWUvrA2 on statistiliselt oluliselt tõusnud A>C asendusmutatsioonide osakaal võrreldes algtüvega PaW85[tüves PaW85 0 ja tüves PaWUvrA2 17,8% ($P<10^{-4}$)]. Võiks oletada, et UvrA2 valk osaleb A>C asendusmutatsioonide tekkimise ärahoidmisel nälgivates *P. putida* rakkudes, kuid valimi maht antud tüve puhul ei ole nii suur, et saaks seda kindlalt väita. Antud valimi mahu juures ei ole PaWATLUvrA2 tüve mutatsioonispekter statistiliselt erinev ei algse tüve PaW85 ega ka tüve PaWATL puhul kirjeldatust.

Tabel 6. *P. putida* algse tüve PaW85 ja tüvede PaWATL, PaWUvrA2 ning PaWATLUvrA2 Phe⁺ revertantide TAG stoppkoodoni muutused kogu nälgimisperioodi vältel. *Saumaa jt., 2007. Statistiliselt oluline erinevus algsest tüvest PaW85 ($P<0,05$) on välja toodud tumedalt märgena ^W.

Sihtmärk	DNA muutus	PaW85*	PaWATL	PaWUvrA2	PaWATLUvrA2
TAG	T > C	164 (77%)	82 (73,9%)	29 (74,4%)	22 (71%)
	T > G	19 (9%)	7 (6,3%)	1 (2,6%)	3 (9,5%)
	T > A	1 (0,5%)	0	0	0
	G > T	12 (5,6%)	2 (1,8%)	1 (2,6%)	2 (6,5%)
	G > C	0	3 (2,7%)^W	0	0
	A > C	0	2 (1,8%)^W	7 (17,8%)^W	0
	A > G	13 (6%)	9 (8,1%)	1 (2,6%)	2 (6,5%)
	A > T	4 (1,9%)	6 (5,4%)	0	2 (6,5%)
Kokku		213	111	39	31

2.3.7. DNA alküülkahjustuste reparatsioonis osaleva *atl* geeni ja NER süsteemi kuuluvate *uvrA* ja *uvrB* geenide defektsuse koosmõju mutatsioonisagedusele nälgivates *P. putida* rakkudes

Selleks, et uurida *uvrA* ja *uvrB* geenide topeltdefektsuse koosmõju ning *atl*, *uvrA* ja *uvrB* geenide kolmikdefektsuse koosmõju mutatsioonisagedusele nälgivates *P. putida* rakkudes, plaatisime pKTpheA22TAG testsüsteemi sisaldavaid *P. putida* algtüve PaW85 rakke, *uvrA uvrB* geenide topeltdefektse tüve PaWUvrAUvrB rakke ning *atl*, *uvrA* ja *uvrB* geenide kolmikdefektse tüve PaWATLUvrAUvrB rakke fenooli minimaaltassile. Phe⁺ revertantide teket jälgisime 14 päeva jooksul. Süsinikunälja tingimustes tekkinud Phe⁺ revertantide kolooniad ilmusid selektiivsöötmetele alates katse kolmandast päevast. Tulemused on toodud joonisel 9.



Joonis 9. Asendusmutatsioonide tulemusena tekkinud Phe⁺ revertantide akumulatsioon *P. putida* algses tüves PaW85 (WT), tüves PaWATL, tüves PaWUvrAUvrB (UvrAUvrB) ja tüves PaWATLUvrAUvrB (ATLUvrAUvrB). Phe⁺ mutantide teke on arvatud 1 x 10⁹ elusraku kohta. Joonisel on esitatud sõltuvalt tüvest 20-70 sõltumatu paralleelkatse tulemused ja standardviga.

Jooniselt 9 on näha, et nälgivas *P. putida* tüves PaWUvrAUvrB on mutatsioonisagedus märgatavalt tõusnud (ca 5 korda) võrreldes algse tüvega PaW85. Järelikult hoiavad valgud UvrA ja UvrB koos ära statsionaarse faasi mutatsioonide tekkimist. Tüves

PaWATLUvrAUvrB on aga mutatsioonisagedus võrreldav algse tüves PaW85 mõõdetuga. See tuleneb ilmselt sellest, et tüves PaWUvrAUvrB seondub ATL valk DNA alküülkahjustusega, kuid kuna UvrA₂UvrB kompleksi ei ole, mis peaks ATL-i eksponeeritud kahjustuse ära tundma, siis ATL valk jääb DNA kahjustust kaitsma ja DNA süntees üle kahjustuse on vigaderohke. Tekkinud vead on ilmselt sellised, mida teised reparatsioonisüsteemid ära ei tunne või ei paranda nii efektiivselt *P. putida* statsionaarse faasi rakkudes. Tüves PaWATLUvrAUvrB aga ei ole ATL valku, mis kahjustust kaitseks ning kahjustus on kättesaadav teistele alküülkahjustusi parandavatele reparatsiooniradadele ning seetõttu on mutatsioonisagedus sarnane algse tüvega PaW85.

Selleks, et analüüsida tekkinud PaWUvrAUvrB Phe⁺ kolooniate mutatsioonispektrit, sekveneerisime kogu nälgimisperioodi jooksul tekkinud Phe⁺ revertantide DNA järjestusi. Tulemused on toodud tabelis 7. Nälgimisperioodil tüves PaWATLUvrAUvrB tekkinud Phe⁺ revertantide mutatsioonispektrit uuritud ei ole.

Mutatsioonispektri analüüs näitab, et tüve PaWUvrAUvrB puhul on statistiliselt oluliselt langenud T>C asendusmutatsioonide hulk [tüves PaW85 77% ja tüves PaWUvrAUvrB 23,2% ($P=0,00$)]. Kuna sama näeme ka tüve PaWUvrA puhul, kuid mitte PaWUvrB tüve puhul, siis ilmselt ongi see *uvrA*-defektsuse mõju. Samuti on A>G asendusmutatsioonide esinemissageduse oluline suurenemine tüves PaWUvrAUvrB võrreldes algse tüvega PaW85 [tüves PaW85 6% ja tüves PaWUvrAUvrB 33,9% ($P<10^{-4}$)] ja A>T asendusmutatsioonide osakaalu oluline suurenemine võrreldes algse tüvega PaW85 [tüves PaW85 1,9% ja tüves PaWUvrAUvrB 23,2% ($P<10^{-4}$)] tingitud ilmselt *uvrA*-defektsuse mõjust, kuna sama näeme ka PaWUvrA tüve puhul, kuid mitte PaWUvrB tüve puhul. A>C asendusmutatsioonide statistiliselt oluline tõus tüves PaWUvrAUvrB võrreldes algse tüvega PaW85 [tüves PaW85 0 ja tüves PaWUvrAUvrB 8,9% ($P<10^{-4}$)] on ilmselt tingitud *uvrB*-defektsuse mõjust, kuna sama mutatsiooni tõusu on näha ka tüves PaWUvrB, kuid mitte tüves PaWUvrA. Tüves PaWUvrAUvrB näeme T>A asendusmutatsiooni statistiliselt olulist tõusu võrreldes algse tüvega PaW85 [tüves PaW85 0,5% ja tüves PaWUvrAUvrB 3,6% ($P=0,0492$)], kuid võrreldes tüvedega PaWUvrA või PaWUvrB ei esine statistiliselt olulist erinevust, millest võib järeldada, et UvrA ja UvrB valgu koostoimel hoitakse ära T>A asendusmutatsioonide teket nälgivates *P. putida* rakkudes.

Tabel 7. *P. putida* algse tüve PaW85, tüve PaWATL ja tüve PaWUvrAUvrB puhul isoleeritud Phe⁺ revertantide TAG stoppkoodoni muutused kogu nälgimisperioodi vältel. *Saumaa jt., 2007. Statistiliselt oluline erinevus algse tüve puhul kirjeldatud mutatsioonidest ($P < 0,05$) on välja toodud tumedalt märges^W.

Sihtmärk	DNA muutus	PaW85*	PaWUvrA	PaWUvrB	PaWUvrAUvrB
TAG	T > C	164 (77%)	18 (31%)^W	42 (84%)	13 (23,2%)^W
	T > G	19 (9%)	4 (6,9%)	4 (8%)	3 (5,4%)
	T > A	1 (0,5%)	0	0	2 (3,6%)^W
	G > T	12 (5,6%)	3 (5,2%)	3 (6%)	1 (1,8%)
	G > C	0	0	0	0
	A > C	0	1 (1,7%)	1 (2%)^W	5 (8,9%)^W
	A > G	13 (6%)	19 (32,8%)^W	0	19 (33,9%)^W
	A > T	4 (1,9%)	13 (22,4%)^W	0	13 (23,2%)^W
Kokku		213	58	50	56

KOKKUVÕTE

Kuna bakterite looduslikus elukeskkonnas on eluks vajalikud tingimused limiteeritud, siis on bakterid looduses enamasti statsionaarses faasis. Statsionaarses faasis aga kuhjuvad mutatsioonid, mis võivad aidata kohaneda olemasolevate elutingimustega, kuid liialt kõrge mutatsioonisagedus on kahjulik ja seepärast on vajalik, et mutatsioonisagedus oleks madal. Stabiilse genoomi saavutamiseks on bakterites välja kujunenud erinevad DNA reparatsioonimehhanismid.

Käesoleva töö kirjanduse ülevaates andsin ülevaate peamistest DNA reparatsioonimehhanismidest bakteris *E. coli* ja statsionaarse faasi mutatsioonide tekkemehhanismidest bakterites *E. coli* ja *P. putida*. Veel andsin ülevaate enamlevinud alküülivatest ühenditest, nende ühendite tekitatud DNA kahjustustest ja alküülkahjustuste reparatsioonist ning lisaks kirjutasin ka sellest, mis on praeguseks teada hiljuti avastatud alküültransferaasi sarnasest valgust ATL.

Töö praktilises osas uurisin alküülkahjustuste reparatsioonis osaleva ATL valku kodeeriva *atl* geeni defektsuse mõju mutatsioonisagedusele kasvavates ja nälgivates *P. putida* rakkudes. Lisaks uurisin *atl* geeni ja NER reparatsiooniraja ensüümide topeltdefektsuse mõju mutatsiooniprotsessidele kasvavates ja nälgivates *P. putida* rakkudes.

Käesoleva töö tulemused võib kokku võtta järgnevalt:

1. *P. putida* alküültransferaasi sarnast valku kodeeriva *atl* geeni defektsuse korral jäi mutatsioonisagedus kasvavates *P. putida* rakkudes algtüvega PaW85 samale tasemele. ATL-i puudumist kasvavates rakkudes kompenseerivad ilmselt teised alküülkahjustuste reparatsioonisüsteemid.
2. *P. putida* NER rajas osalevaid UvrB ja UvrA2 valke kodeerivate *uvrB* ja *uvrA2* geenide defektsuse korral oli spontaansete mutatsioonide tekkesagedus kasvavates rakkudes statistiliselt oluliselt suurenenud võrreldes algse tüvega PaW85, mis viitab sellele, et kasvavates *P. putida* rakkudes osalevad valgud UvrB ja UvrA2 spontaansete mutatsioonide ärahoidmises. Samas ATL-UvrB-topeltdefektses tüves oli spontaansete mutatsioonide tekkesagedus võrreldes tüvega PaWUvrB ligikaudu 10 korda ja

ATLUvrA2-topeltdefektses tüves võrreldes tüvega PaWUvrA2 ligikaudu 18 korda madalam. Seega kuna nii UvrB- kui ka UvrA2-defektses tüves on ATL funktsionaalne, ent mutatsioonisagedus on kõrgem kui ATLUvrB- ja ATLUvrA2-defektses tüves, siis võib see viidata sellele, et ATL presenteerib küll kahjustust UvrA-le, aga NER rada edasi korrektselt ei toimi ja ATL olemasolu soodustab seega mutatsioonide teket.

3. *atl* geeni inaktiveerimine *P. putida* tüves suurendas statsionaarse faasi mutatsioonisagedust mõnevõrra võrreldes algtüvega alles vaadeldud nälgimisperioodi kahel viimasel päeval, millest võib järeldada, et NER töötab piisavalt efektiivselt ka ilma ATL valguta ja alles pikaajalisel nälgimisperioodil võib ATL osaleda statsionaarse faasi mutatsioonide tekkimise ärahoidmisel. ATL-i puudumist võivad kompenseerida ka teised alküülkahjustuste reparatsioonisüsteemid nälgivates *P. putida* rakkudes. Mutatsioonisageduse väike tõus võib olla põhjustatud ka sellest, et pika nälgimisperioodi jooksul tekivad sellised endogeensed alküülivad ühendid, mis põhjustavad suuremaid DNA alküülkahjustusi, mida parandab vaid NER rada ja ATL võib olla suuremate kahjustuste presenteerimisel NER rajale hädavajalik. Mutatsioonispektri analüüsist selgus, et ATL on nälgimisperioodi kestel funktsionaalne ja oluline nälgivates *P. putida* rakkudes G>C ja A>C asendusmutatsioonide tekkimise ärahoidmisel.
4. NER raja valke kodeerivate *uvrA*, *uvrB* ja *uvrA2* geenide inaktiveerimine bakteris *P. putida* tõstis statsionaarse faasi mutatsioonide tekkesagedust võrreldes algtüvega. Seega osalevad NER raja valgud mutatsioonide tekke ärahoidmises nälgivates *P. putida* rakkudes ning UvrA ja UvrB osalevad selles protsessis ilmselt koos.
5. ATL valgul on töös uuritud NER suhtes inaktiivsetes tüvedes nälgivates rakkudes toimuvatele mutatsiooniprotsessidele kahetine mõju: *uvrA* geeni defektsuse korral osaleb ATL statsionaarse faasi mutatsioonide tekkimise ärahoidmisel, seevastu *uvrB* ja *uvrA2* defektsuse puhul ning *uvrB* ja *uvrA* topeltdefektsuse korral soodustab ATL olemasolu statsionaarse faasi mutatsioonide tekkimist vaadeldud nälgimisperioodi vältel. NER raja inaktiveerimine *atl*-defektses tüves (PaWATLUvrAUvrB) ei mõjutanud statsionaarse faasi mutatsioonisagedust võrreldes algtüvega, seega jääb sel juhul alküülkahjustus kättesaadavaks teistele (alküülkahjustuste) reparatsioonis osalevatele süsteemidele.

6. Mutatsioonispektrite analüüs näitas, et kõik vaadeldud NER raja valgud on nälgimisperioodi vältel funktsionaalsed. UvrA osaleb A>G ja A>T ning UvrB A>C asendusmutatsioonide tekkimise ärahoidmisel. UvrA ja UvrB koostoimel hoitakse ära T>A asendusmutatsioonide teket. UvrA valk osaleb T>C asendusmutatsioonide tekitamises juhul, kui ATL on funktsionaalne ning ATL ja UvrB hoiavad koos ära A>T asendusmutatsioonide teket.

RESÜMEE

The involvement of alkyltransferase-like protein in the mutational processes in bacterium *Pseudomonas putida*

Kaarel Laak

Resume

There are many factors limiting the growth of bacteria in the nature, such as pH, osmolarity and temperature. In addition, the availability of nutrients is also limited. For that reason, bacteria are mostly in the stationary phase in the nature. In the stressful situations bacteria start to evolve rapidly, whereas mutants that are more adapted to the environment will become majority. The rapid evolution of such bacteria is caused by mutations accumulating in the cells of stationary phase and mutations themselves are caused by endogenous and exogenous DNA damaging agents and radiation. The endogenous DNA damaging agents are mainly alkyl compounds and reactive oxygen species. Mutations may provide better adaptability with environment, but in very high rate they become harmful for the cells. Thereby it is necessary, that the mutation rate is kept low in the cell. In order to preserve the stability of the genome, bacteria have many different DNA repair mechanisms. The mutational processes occurring in growing and stationary phase bacteria are different and as bacteria in their natural environments are in stationary phase most of the time, it is necessary to understand what kind of mechanisms trigger such mutations.

In the literature review of my study I gave an overview of most known repair mechanisms in bacterium *E. coli* and mutation generation mechanisms in stationary phase in bacteria *E. coli* and *P. putida*. Furthermore, I described some common alkylating agents, the DNA damages these compounds cause, DNA alkylation damage repair systems, and also described all the known data of ATL, the alkyltransferase-like protein, that has been recently discovered.

In the experimental part of my work, I firstly studied the effect of inactivation of the *atl* gene encoded by ATL protein to the mutational processes in growing and starving *P. putida* cells. Secondly, I studied the impact of *atl* gene deficiency in nucleotide excision repair deficient backgrounds to the mutational processes in growing and starving cells of *P. putida*.

The results of this research is summarized as follows:

1. The mutation frequency in growing *P. putida* cells deficient in *atl* gene which encodes for alkyltransferase-like protein, was comparable with that of wild type cells of *P. putida* strain PaW85. The absence of ATL in growing cells is probably compensated by other alkylation damage repair systems.
2. Compared to the wild type PaW85, the frequency of spontaneous mutations measured with the Rif^R testsystem is statistically significantly increased in the *uvrB*- and *uvrA2*-deficient cells ,encoding for NER pathway proteins UvrB and UvrA2, respectively. This indicates that UvrB and UvrA2 proteins participate in avoidance of spontaneous mutations in *P. putida* cells. The frequency of spontaneous mutations in ATLUvrB double defective strain was decreased about 10 times compared to the PaWUvrB strain. Similarly, the frequency of spontaneous mutation in ATLUvrA2 double defective strain was decreased about 18 times compared with PaWUvrA2 strain. Therefore, as in *uvrB*- and in *uvrA2*-defective strains ATL is functional, but the mutation frequency is higher than in ATLUvrB- and in ATLUvrA2-defective strains. It might indicate that although ATL presents the damage to UvrA, NER pathway does not function properly and the existence of ATL induces mutagenesis.
3. The inactivation of *atl* gene in *P. putida* strain increased the mutation frequency of stationary phase cells compared to the wild type bacteria during the last days of the starvation period studied. From this it is possible to conclude that without the functional ATL protein NER works efficiently enough and that ATL can participate in the prevention of mutations in stationary phase only in a longer starvation period. Other alkylation damage repair systems can also compensate the absence of ATL in starving *P. putida* cells. The minor increase in mutation frequency might also be caused by the fact that during a long starvation period endogenous alkylating compounds, that cause larger DNA alkyl damages to form can only be repaired by NER pathway and ATL could be essential in presenting these damage to NER. The mutation spectra analysis indicates that ATL is functional during the starvation period studied and important in prevention of the generation of G>C and A>C substitution mutations in starving *P. putida* cells.

4. The inactivation of *uvrA*, *uvrB* and *uvrA2* genes that encode for the NER pathway proteins in *P. putida* increased the frequency of stationary phase mutations compared to the wild type. Therefore, the NER pathway proteins participate in prevention of the mutagenesis in starving *P. putida* cells and UvrA and UvrB are probably participating together in this process.
5. ATL protein can influence the investigated mutation processes in NER-inactive strains and starving cells in two ways: in the case of a defective *uvrA* gene ATL participates in preventing the stationary phase mutagenesis and in the case of *uvrB* and *uvrA* double defective cells ATL induces the stationary phase mutagenesis during the observed starvation period. The inactivation of NER pathway in *atl*-defective strain (PaWATLUvrAUvrB) did not influence the stationary phase mutation frequency compared to the wild type, therefore in this case the alkyl damage remains accessible to other systems that participate in repair.
6. The mutation spectra analysis showed that all the observed proteins of NER pathway are functional during the starvation period studied. UvrA participates in prevention of generation of A>G and A>T substitution mutations whereas UvrB prevents the occurrence of generation of A>C substitution mutation. With interaction of UvrA and UvrB, T>A substitution mutations are avoided. UvrA protein participates in the generation of T>C substitution mutations in the case of functional ATL and ATL together with UvrB prevent the generation of A>T substitution mutations.

KIRJANDUSE LOETELU

Abella, M., Erill, I., Jara, M., Mazón, G., Campoy, S., Barbé, J. (2004). Widespread distribution of a *lexA*-regulated DNA damage-inducible multiple gene cassette in the *Proteobacteria* phylum. *Mol. Microbiol.* 54: 212-222.

Adams, M. H. (1959). *Bacteriophages*. Interscience Publishers Inc. N. Y. p. 445-447.

Autret, S., Levine, A., Vannier, F., Fujita, Y., Séror, S. J. The replication checkpoint control in *Bacillus subtilis*: identification of a novel RTP-binding sequence essential for the replication fork arrest after induction of the stringent response. *Mol. Microbiol.* 31: 1665-1679.

Bauchop, T., Elsdén, S. R. (1960). The growth of micro-organisms in relation to their energy supply. *J. Gen. Microbiol.* 23: 457-469.

Bayley, S. A., Duggleby, C. J., Worsey, M. J., Williams, P. A., Hardy, K. G., Broda, P. (1977). Two models of loss of the TOL function from *Pseudomonas putida* mt-2. *Mol. Gen. Genet.* 154: 203-204.

Bjedov, I., Dasgupta, C. N., Slade, D., Le Blastier, S., Selva, M., Matic, I. (2007). Involvement of *Escherichia coli* DNA polymerase IV in tolerance of cytotoxic alkylating DNA lesions in vivo.

Bowles, T., Metz, A. H., O'Quin, J., Wawrzak, Z., Eichman, B. F. (2008). Structure and DNA binding of alkylation response protein AidB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 105: 15299-15304.

Boyer, H. W., Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.

Bridges, B. A. (1998). The role of DNA damage in stationary phase ('adaptive') mutation. *Mutat. Res.* 408: 1-9.

- Cairns, J., Foster, P. L. (1991). Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*. *Genetics*. 128: 695-701.
- Campbell, E. A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., Darst, S. A. (2001). Structural mechanisms for rifamicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*. 104: 901-912.
- Cornelis, P. (2010). Iron Uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl. Microbiol. Biotech.* 86: 1637-1645.
- Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P. O., Hanawalt, P. C. (2001). Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS deficient *Escherichia coli*. *Genetics*. 58: 41-64.
- Cupples, C. G., Miller, J. H. (1988). Effects of amino acid substitutions at the active site in *Escherichia coli* β -galactosidase. *Genetics*. 120: 637-644.
- Chang, D. E., Smallery, D. J., Conway, T. (2002). Gene expression profiling of *Escherichia coli* growth transitions: an expanded stringent response model. *Mol. Microbiol.* 45: 289-306.
- David-Cordonnier, M. H., Laval, J., O'Neill, P. (2000). Clustered DNA damage, influence on damage excision by XRS5 nuclear extracts and *Escherichia coli* Nth and Fpg proteins. *J. Biol. Chem.* 275: 11865-11873.
- Deaconescu, A. M., Artsimovitch, I., Grigorieff, N. (2012). Interplay of DNA repair with transcription: from structures to mechanisms. *Trends Biochem Sci.* 37: 543-552.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., Timmis, K. N. (1990). Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172: 6568-6572.
- Dizdaroglu, M. (2005). Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. *Mutat. Res.* 591: 45-59.

Drablos, F., Feyz E., Aas, P. A., Vaagbo, C. B., Kavli, B., Bratlie, M. S., Pena-Diaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G., Krokan, H. E. (2004). Alkylation damage in DNA and RNA-repair mechanisms and medical significance. *DNA repair*. 3: 1389-1407.

Erill, I., Campoy, S., Mazón, G., Barbé, J. (2006). Dispersal and regulation of an adaptive mutagenesis cassette in the bacteria domain. *Nucleic. Acids Res.* 34: 66-77.

Figurski, D. H., Helinski, D. R. (1979). Replication an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *PNAS*. 76(4): 1648-1652.

Foster, P. L., Cairns, J. (1992). Mechanisms of directed mutation. *Genetics*. 131: 783-789.

Foster, P. L. (1993). Adaptive mutation: the uses of adversity. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 467-504.

Foster, P. L. (2007). Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 42: 373-397.

Foster, P. L. (2005). Stress responses ang genetic variation in bacteria. *Mutat. Res.* 569: 3-11.

Foster, P. L., Trimarcho, J. M., Maurer, R. A. (1996). Two enzymes, both of which process recombination intermediates, have opposite effect on adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Genetics*. 142: 25-37.

Foster, P. L., Trimarchi, J. M. (1994). Adaptive reversion of a farmshift mutation in *Escherichia coli* by simple base deletions in homopolymeric runs. *Science*. 265: 407-409.

Foster, P. L., Trimarchi, J. M. (1995). Adaptive reversion of an episomal frameshift mutation in *Escherichia coli* requiers conjugal functions but not actual conjugation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 92: 5487-5490.

Foster, P. L. (1999). Mechanisms of statsionary phase mutation: a decade of adaptive mutation. *Annu. Rev. Genet.* 33: 57-88.

- Fu, D., Calvo, J. A., Samson, L. D. (2012). Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylation agents. *Nature*. 12: 104-119.
- Fromme, J. C., Banarjee, A., Verdine, G. L. (2004). DNA glycosylase recognition and catalysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14: 43-49.
- Gariyban, L., Huang, T., Kim, M., Wolff, E., Nguyen, A., Nguyen, T., Diep, A., Hu, K., Iverson, A., Yang, H., Miller, J. H. (2003). Use of the *rpoB* gene determine the specificity of base substitution mutations on the *Escherichia coli* chromosome. *DNA repair*. 2: 593-608.
- Gentry, D. R., Hernandez, V. J., Nguyen, L. H., Jenses, D. B., Cashel, M. (1993). Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp. *J. Bacteriol.* 175: 7982-7989.
- Gourse, R. L., Keck, J. L. (2007). Magic spots cast a spell on DNA primase. *Cell*. 128: 823-824.
- Grzesiuk, E., Gozdek, A., Tudek, B. (2001). Contribution of *E. coli* AlkA, TagA glycosylases and UvrABC-excinuclease in MMS mutagenesis. *Mutat. Res.* 480-481: 77-84.
- Grossman, L., Kovalsky, O. (2001). Nucleotide Excision Repair in Bacteria. *Enc. Of Life Sci.*
- Haas, D., Keel, C. (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41: 117-153.
- Hall, B. G. (1995). Genetics of selection-induced mutations: I. *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, and *uvrD* are selection-induced specific mutator loci. *J. Mol. Evol.* 40: 86-93.
- Hamill, M. J., Jost, M., Wong, C., Bene, N. C., Drennan, C., L., Elliott, S. J. (2012). Electrochemical Characterization of *Escherichia coli* Adaptive Response Protein AidB. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 16899-16915.

Harris, R. S., Longerich, S., Rosenberg, S. M. (1994). Recombination in adaptive mutation. *Science*. 264: 258-260.

Harris, R. S., Ross, K. J., Rosenberg, S. M. (1996). Opposing roles of the holliday junction processing system of *Escherichia coli* in recombination-dependent adaptive mutation. *Genetics*. 142: 681-691.

Hastings, P. J., Hersh, M. N., Thornton, P. C., Fonville, N. C., Slack, A., Frisch, R. L., Ray, M. P., Harris, R. B., Leal, S. M., Rosenberg, S. M. (2010). Competition of *Escherichia coli* DNA Polymerases I, II and III with DNA Pol IV in Stressed Cells. *Plos One*. 5: 1-10.

Hengge-Aronis, R. (2002). Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 373-395.

Herrero, M. V., de Lorenzo, V., Timmis, K. N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for the cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram negative bacteria. *J. Bacteriol.* 172: 6557-6567.

Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 395-418.

Ivančić-Baće, I., Peharec, P., Moslavac, S., Škrobot, N., Salaj-Šmic, E., Brčić-Kostić, K. (2002). RecFOR function is required for DNA repair and recombination in a RecA loading-deficient recB mutant of *Escherichia coli*. *Genetics*. 163: 485-492.

Jackson A. L., Loeb L. A. (2001). The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat. Res.* 477: 7-21.

Jatsenko, T., Tover, A., Tegova, R., Kivisaar, M. (2010). Molecular characterization of Rif(r) mutations in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Mutat. Res.* 683: 106-114.

Jeltsch, A. (2002). Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem*. 3: 247-293.

Jun, S-H., Kim, T. G., Ban, C. (2006). DNA mismatch repair system. Classical and fresh roles. FEBS Journal. 273: 1609-1619.

Kairpun, C., Scott, R. J. (2007). Base excision repair and the role of *MUTYH*. Hered. Cancer in Clin. Prac. 5(4): 199-209.

Kanamitsu, K., Ikeda, S. (2010). Early Steps in the DNA Base Excision Repair Pathway of a Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Jour. Of Nuc. Acids. 2010: 450926.

Kanjee, U. Ogata, K., Houry, W. A. (2012). Direct binding targets of the stringent response alarmone (p)ppGpp. Mol. Microbiol. 85: 1029-1043.

Kasak, L., Hõrak, R., Kivisaar, M. (1997). Promoter-creating mutations in *Pseudomonas putida*: a model system for the study of mutation in starving bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 94: 3134-3149.

Kivisaar, M. (2010). Mechanisms of stationary-phase mutagenesis in bacteria: mutational processes in pseudomonads. FEMS Microbiol. 312: 1-14.

Kleibl, K. (2002). Molecular mechanisms of adaptive response to alkylating agents in *Escherichia coli* and some remarks on O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase in other organisms. Mutat. Res. 512: 67-84.

Koch, B., Jensen, L. E., Nybroe, O. (2001). A panel of Tn7-based vectors for insertion of the *gfp* marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. J. Microbiol. 45: 187-195.

Koorits, L., Tegova, R., Tark, M., Tarassova, K., Tover, A., Kivisaar, M. (2007). Study of involvement of ImuB and DnaE2 in stationary-phase mutagenesis on *Pseudomonas putida*. DNA repair. 6: 863-868.

Kowalczykowski, S. C. (2000). Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. Trends. Biochem. Sci. 25: 156-165.

- Kowalczykowski, S. C., Dixon, D. A., Eggleston, A. K., Lauder, S. D., Rehaurer, W. M. (1994). Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 58: 401-465.
- Kumar, R., Rao, D. N. (2012). Role of DNA methyltransferases in epigenetic regulation in bacteria. Sub. Biochem. 61: 81-102.
- Kunder, L. (2010). DNA oksüdatiivsete ja alküülkahjustuste reparatsiooni osalus mutatsioonide ärahoidmises bakteris *Pseudomonas putida*. Bakalaureusetöö.
- Kunkel, T. A., Erie, D. A. (2005). DNA mismatch repair. Annu. Rev. Biochem. 74: 681-710.
- Kvint, K., Farewell, A., Nyström, T. (2000). RpoS-dependent promoters require guanosine tetraphosphate for induction even in the presence of high levels of sigma(s). J. Biol. Chem. 275: 14795-14798.
- Krokan, H. E., Standal, R., Slupphaug, G. (1997). DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. Biochem J. 325: 1-16.
- Krwawicz, J., Arczewska, K. D., Speina, E., Maciejewska, A., Grzesiuk, E. (2007). Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 1. Mutations in genes involved in base excision repair (BER) and DNA-end processors and their implication in mutagenesis and human disease. Acta Biochim. Pol. 54: 413-434.
- Lanka, E., Pangsegrau, W. (1999). Genetic Exchange Between Microorganisms, p. 408-415. In J. W. Lengeler, G. Drews, H. G. Schlegel (ed.), Biology of the Prokaryotes, Blackwell Science, Stuttgart.
- Layton, J. C., Foster, P. L. (2003). Error-prone DNA polymerase IV is controlled by the stress-response sigma factor, RpoS, in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 50: 549-561.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature. 362: 709-715.

- Ling, H., Boudsocq F., Woodgate, R., Yang, W. (2001). Crystal structure of a Y-family DNA polymerase in action: a mechanism for error-prone and lesion-bypass replication. *Cell*. 107: 91-102.
- Maki, H., Sekiguchi, M. (1992). MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature*. 355: 273-275.
- Makiela-Dzbenska, K., Jaszczur, M., Banach-Orlowska, M., Jonczyk, P., Schaaper, R. M., Fijalkowska, I. J. (2009). Role of *Escherichia coli* DNA polymerase I in chromosomal DNA replication fidelity. *Mol. Microbiol.* 74: 1114-1127.
- Mamun, A. A. M. A. (2007). Elevated expression of DNA polymerase II increased spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 625: 29-39.
- Marginson, G. P., Povey A. C., Kaina, B., Santibáñez-Koref, M. F. (2003). Variability and regulation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis*. 24: 625-635.
- Marginson, G. P., Butt, A., Pearson, S. J., Wharton, S., Watson, A. J., Marriott, A., Caetano, C. M., Hollins, J. J., Rukazenkova, N., Begum, G., Santibáñez-Koref, M. F. (2007). Alkyltransferase-like proteins. *DNA repair*. 6(8): 1222-1228.
- Mazurek, A., Berardini, M., Fishel, A. (2002) Activation of human MutS homologs by 8-oxo-guanine DNA damage. *J. Biol. Chem.* 277: 8260-8266.
- McKenzie, G. J., Lee, P. L., Lombardo, M. J., Hastings, P. J., Rosenberg, S. M. (2001). SOS mutator DNA polymerase IV function in adaptive mutation and not adaptive amplification. *Mol. Cell*. 7: 571-579.
- Messner, K. R., Imlay, J. A. (2002). Mechanisms of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. *J. Biol. Chem.* 277: 42563-42571.
- Michaels, M. L., Cruz, C., Grollman, A. P., Miller J. H. (1992). Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 89: 7022-1025.

Michaels, M. L., Miller, J. H. (1992). The GO System Protects Organisms from the Mutagenic Effect of the Spontaneous Lesion 8-hydroxyguanine (7,8-Dihydro-8-Oxoguanine). Jour. of Bacteriology. 174: 6321-6325.

Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbour Press, N. Y.

Modrich, P., Lahue, R. (1996). Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. Annu. Rev. Biochem. 65: 101-133.

Morita, R., Nakagawa, N., Kuramitsu, R. (2008). An O6-methylguanine-DNA methyltransferase-like protein from *Thermus thermophilus* interacts with a nucleotide excision repair protein. J. Biochem. 144: 267-277.

Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., jt. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. Env. Microbiol. 12: 799-808.

Nieminszczy, J., Grzesiuk, E. (2007). Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 3. AlkB dioxygenase and Ada methyltransferase in the direct repair of alkylated DNA. Acta Biochim. Pol. 54: 459-468.

Nohmi, T. (2006). Environmental stress and lesion-bypass DNA polymerases. Annu. Rev. Microbiol. 60: 231-253.

Nowosielska, A. (2007). Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 5. The role of recombination in DNA repair and genome stability. Acta Biochim. Pol. 54: 483-494.

Olinski R., Jaruga, P., Rozalski, R., Gackowski, D., Foksiski, M., Guz, J., Dziaman, T., Szpila, A., Tudek, B. (2007). Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age-related diseases. Acta Biochim. 54: 11-26.

Onodera, T., Morino, K., Tokishita, S., Morita, R., Masui, R., Kuramitsu, S., Ohta, T. (2011). Role of alkyltransferase-like (ATL) protein in repair of methylated DNA lesion in *Thermus thermophilus*. Mutagenesis. 26: 303-308.

Pavel, H., Forsman, M., Shingler, V. (1994). An aromatic effector specificity mutant of the transcriptional regulator DmpR overcomes the growth constraints of *Pseudomonas* sp. Strain CF600 on para-substituted methylphenols. *J. Bacteriol.* 176(24): 7550-7557.

Pearson, S. J., Ferguson, J., Santibáñez-Koref, M., Marginson, G. P. (2005). Inhibition of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by an alkyltransferase-like protein from *Escherichia coli*. *Nucleic. Acids Res.* 33: 3837-3844.

Pearson, S. J., Wharton, S., watson, A. J., Begum, G., Butt, A., Glynn, N., Williams, D. M., Shibata, T., Santibáñez-Koref, M. F., Marginson, G. P. (2006). A novel DNA recognition protein in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic. Acids. Res.* 34: 2347-2354.

Petit, C., Sancar, A. (1998). Nucleotide excision repair: From *E. coli* to man. *Biochemie.* 81: 15-25.

Pham, P., Rangarajan, S., Woodgate, R., Goodman, M. F. (2001). Roles of DNA polymerases V and II in SOS-induced error-prone and error-free repair in *Escherichia coli*. *PNAS.* 98: 8350-8354.

Pieper, D. H., Reineke, W. (2000). Engineering bacteria for bioremediation. *Curr. Opin. Biotech.* 11: 262-270.

Posnick, L. M., Samson, L. D. (2001). DNA repair. *Enc. Of Life Sci.*

Preston, B. D., Singer, B., Loeb, L. A. (1986). Mutagenic potential of O4-methyltymine in vivo determined by an enzymatic approach to site-specific mutagenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 83: 8501-8505.

Radicella, J. P., Park, P. U., Fox, M. S. (1995). Adaptive mutations in *Escherichia coli*: a role of conjugation. *Science.* 268: 418-420.

Ramos-Gonzalez, M.I., Campos, M.J., Ramos, J.L. (2005). Analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 gene expression in the maize rhizosphere: in vivo [corrected] expression technology capture and identification of root-activated promoters. *J Bacteriol.* 187: 4033-4041.

Rangarajan, S., Gudmundsson, G., Qiu, Z., Foster, P. L., Goodman, M. F. (1997). *Escherichia coli* DNA polymerase II catalyses chromosomal and episomal DNA synthesis *in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 95: 946-951.

Reardon, J. T., Sancar A. (2005). Nucleotide excision repair. Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Bio. 79: 183-235.

Reißner, T., Schorr, S., Carell, T. (2009). Once Overlooked, Now Made Visible: ATL Proteins and DNA Repair. Angew. Chem. Int. Ed. 48: 7293-7295.

Roberts, J., Park, J. S. (2005). Mfd, the bacterial transcription repair coupling factor: translocation, repair and termination. Curr Opin Microbiol. 7: 120-125.

Rocha, E. P. C., Cornet, E., Michel, B. (2005). Comparative and Evolutionary Analysis of the Bacterial Homologous Recombination Systems. PloS Genet. 1: 247-259.

Rosenberg, S. M., Longerich, S., Gee, P., Harris, R. S. (1994). Adaptive mutation by deletion in small mononucleotide repeats. Science. 265: 405-407.

Saumaa, S., Tarassova, K., Tark, M., Tover, A., Tegova, R., Kivisaar, M. (2006). Involvement of DNA mismatch repair in stationary-phase mutagenesis during prolonged starvation of *Pseudomonas putida*. DNA Repair. 5: 505-514.

Saumaa, S., Tover, A., Kasak, L., Kivisaar, M. (2002). Different spectra of stationary-phase mutations in early-arising versus late-arising mutants of *Pseudomonas putida*: involvement of the DNA repair enzyme MutY and the stationary-phase sigma factor RpoS. J. Bacteriol. 184: 6957-6965.

Saumaa, S., Tover, A., Tark, M., Tegova, R., Kivisaar, M. (2007). Oxidative DNA damage defense system in avoidance of stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 189: 5504-5514.

Savery, N. J. (2007). The molecular mechanism of transcription-coupled DNA repair. Trends Microbiol. 15: 326-333.

- Schreiber, G., Ron, E. Z., Glaser, G. (1995). ppGpp mediated regulation of DNA replication and cell division in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 30: 27-32.
- Sedgwick, B. (2004). repairing DNA-methylation damage. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5: 148-157.
- Sedgwick, B., Lindahl, T. (2002). Recent progress on the Ada response for inducible repair of DNA alkylation damage. *Oncogene.* 21: 8889-8894.
- Sedgwick, B., Bates, P. A., Paik, J., Jacobs, S. C., Lindahl, T. (2007). Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA repair.* 6: 429-442.
- Shen, C. H., Chiang, Y. C., Hsu, C. H., Yang, M. K. (2007). Identification and characterization of two *uvrA* genes of *Xanthomonas axonopodis* pathovar citri. *Mol Genet Genomics.* 277: 149-160.
- Shrivastav, N., Li, D., Essigmann, J. M. (2010). Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular response to DNA alkylation. *Carcinogenesis.* Vol 31: 59-70.
- Shrivastava, D. B., Darst, S. A. (2010). Derepression of bacterial transcription-repair coupling factor is associated with a profound conformational change. *J. Mol. Biol.* 406: 275-284.
- Sidorenko, J., Jatsenko, T., Saumaa, S., Teras, R., Tark-Dame, M., Hõrak, R., Kivisaar, M. (2011). Involvement of specialized DNA polymerases Pol II, Pol IV and DnaE2 in DNA replication in the absence of Pol I in *Pseudomonas putida*. *Mutat. Res.* 714: 63-77.
- Tarassova, K., Tegova, R., Tover, A., Teras, R., Tark, M., Saumaa, S., Kivisaar, M. (2009). Elevated mutation frequency in surviving populations of carbon-starved *rpoS*-deficient *Pseudomonas putida* is caused by reduced expression of superoxide dismutase and catalase. *J. Bacteriol.* 191: 3604-3614.
- Tark, M., Tover, A., Koorits, L., Tegova, R., Kivisaar, M. (2008). Dual role of NER in mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *DNA Repair.* 7: 20-30.

- Tark, M., Tover, A., Tarassova, K., Tegova, R., Kivi, G., Hõrak, R., Kivisaar, M. (2005). A DNA polymerase V homologue encoded by TOL plasmid pWW0 confers evolutionary fitness on *Pseudomonas putida* under conditions of environmental stress. *J. Bacteriol.* 187: 5203-5213.
- Tegova, R., Tover, A., Tarassova, K., Tark, M., Kivisaar, M. (2004). Involvement of error-prone DNA polymerase IV in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 186: 2735-2744.
- Timmis, K. N., Pieper, D. H. (1999). Bacteria designed for bioremediation. *Trends Biotech.* 17: 200-204.
- Traxler, M. F., Chang, D. E., Conway, T. (2006). Guanosine 3', 5'-bispyrophosphate coordinates global gene expression during glycolose-lactose diauxie in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103: 2374-2379.
- Tubbs, J. L., Latypov, V., Kanugula, S., Butt, A., Melikishvili, M., Kraehenbuehl, R., Fleck, O., Marriott, A., Watson, A.J., Verbeek, B., McGown, G., Thorncroft, M., Santibáñez-Koref, M. F., Millington, C., Arvai, A. S., Kroeger, M. D., Peterson, L. A., Williams, D. M., Fried, M. G., Marginson, G. P., Pegg, A. E., Tainer, J. A. (2009). Flipping of alkylated DNA damage bridges base and nucleotide excision repair. *Nature.* 459: 808-813.
- Tubbs, J. L., Tainer, J. A. (2010). Alkyltransferase-like proteins: molecular switches between DNA repair pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* 67: 3749-3762.
- Tudek, B. (2007). Base excision repair modulation as a risk factor for human cancers. *Mol. Aspects Med.* 28: 258-275.
- van Hoffen, A., Balajee, A. S., van Zeeland, A. A., Mullenders, L. H. F. (2003). Nucleotide excision repair and its interplay with transcription. *Toxicologi.* 193: 79-90.
- Wade, J. T., Reppas, N. B., Church, G. M., Struhl, K. (2005). Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the *Escherichia coli* genome and identifies unconventional target sites. *Genes Dev.* 19: 2619-2630.

Wang, J. D., Sanders, G. M., Grossman, A. D. (2007). Nutritional control of elongation of DNA replication by (p)ppGpp. *Cell*. 128: 865-875.

White, O., Eisen, J. A., Heidelberg, J. F., et al. (1999). Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1. *Science*. 286: 1571-1577.

Yang, W. (2003). Damage repair DNA polymerases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13: 23-30.

Zharkov, D. O. (2008). Base excision DNA repair. *Cell. Mol. Life Sci.* 65: 1554-1565.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://cmr.jcvi.org>

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kaarel Laak

(sünnikuupäev: 20.03.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Alküültransferaasi-sarnase valgu osalus mutatsiooniprotsessides bakteris *Pseudomonas putida*,

mille juhendajad on Ph.D. Signe Saumaa ja Ph.D. Maia Kivisaar

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 01.06.2013 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.05.2013